



Secretaría de Educación Pública



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

“Producción de celulasas de *Aspergillus niger* ITV-02”

Tesis

Que para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

IBQ. Alejandra Miranda Sosa

Asesores:

Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga

Dra. Sandra T. del Moral Ventura

H. Veracruz Ver.

14 Junio, 2019

“Producción de celulasas de *Aspergillus niger* ITV-02”

por:

ALEJANDRA MIRANDA SOSA

Tesis propuesta a la
Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos
del
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ

Como requerimiento parcial para
obtener el grado de

Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

ASESORES:

Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga

Dra. Sandra T. del Moral Ventura

DEDICATORIAS

A mi **Mamá** por ser siempre mi pilar en todos los sentidos de mi vida, gran parte de la persona que soy hoy es obra tuya y este logro es tuyo también.

A mis hermanas **Nora** y **Viri**, mis sobrinos **Pepe toño** y **Gael**, por brindarme su apoyo todo el tiempo y ayudarme cuando más los necesité.

A **Roberto**, por respaldar cada decisión y alentarme a conseguir mis metas, por escucharme y cuidarme aun y en la distancia, y sobre todo por el apoyo y el amor incondicional que me das todos los días.

A mi asesora la **Dra. Lupita**, por darme la oportunidad y la confianza de formar parte de su equipo de trabajo, permitirme crecer profesionalmente trabajando en todos sus proyectos y por compartir conmigo todos sus conocimientos.

A mi asesora la **Dra. Sandra**, por su apoyo, consejos y enseñanzas que me brindo durante este proyecto.

A la **Dra. Carolina** y al **Dr. Joel**, por sus aportaciones y conocimientos los cuales hicieron que este trabajo fuera mejor.

A **Paty** y **Chío**, porque tenerlas a ustedes es como tener otro par de mamás que me apoyan y me animan diariamente, siempre me sentiré la más afortunada de tenerlas.

A mis amigos **Manolo**, **Karina** y **Majo**, por siempre echarme porras y creer tanto en mí, su motivación diaria me ha ayudado a estar aquí, soy muy feliz de tenerlos.

A mis **compañeros de laboratorio**, en especial a Flor, Isa, Lupita, Naye, Liz e Inés, por el apoyo moral que siempre me brindaron, las risas que me sacaron, las frustraciones que compartimos, las técnicas y el conocimiento que me dieron y la amistad que me dejaron, me las llevo para siempre.

A mis **compañeros de maestría**, Olga, Kalid, Hugo, Chucho, Samuel y Poncho, por compartir tanto durante las clases y en el laboratorio.

RECONOCIMIENTOS

Al **Instituto Tecnológico de Veracruz**, que por medio de la **Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos** ayudan a desarrollar e innovar proyectos que mejoren a nuestra a sociedad mediante sus programas de posgrados de calidad.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría, así como la estancia realizada y el financiamiento brindado en el proyecto SAGARPA-CONACYT No. 2017-03-291143.

A mi asesora la **Dra. Ma. Guadalupe Aguilar Uscanga**, quien me brindó todo su apoyo desde la licenciatura y quien me introdujo en mi formación de investigadora.

A mi asesora la **Dra. Sandra T. del Moral Ventura**, por su apoyo en el desarrollo de este trabajo, gracias por el conocimiento brindado, los consejos y observaciones, para el mejoramiento del proyecto y sobre todo la paciencia dada.

A mis revisores la **Dra. Carolina Peña Montes** y el **Dr. J. Joel Espinoza de los M. Fernández** por apoyarme en el desarrollo, la presentación y culminación de este trabajo, contribuyendo de manera significativa en mi crecimiento profesional.

Al **Dr. José Manuel Domínguez González** profesor de la Facultad de Ciencias en la Universidad de Vigo en Ourense por brindarme todo lo necesario para realizar una estancia exitosa.

A la **Mtra. Dulce M. Dermitz** y a la **Mtra. Patricia Hayward** por el apoyo en la revisión del resumen en inglés.

RESUMEN

Miranda Sosa, Alejandra. M.C. en Ingeniería Bioquímica, Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos, Junio, 2019. "Producción de celulasas de *Aspergillus niger* ITV-02". Asesores: Aguilar Uscanga Ma. Guadalupe, del Moral Ventura Sandra T.

Las celulasas son enzimas que hidrolizan enlaces (1→4)-β-D-glicosídicos de celulosa, liquenina y β-D-glucanos y por ello tienen diversos usos tales como: en la producción de alimento para ganado, en la industria textil, en la industria alimentaria y en la producción de bioetanol de segunda generación para la hidrólisis de residuos lignocelulósicos, sin embargo, el alto costo de las celulasas es una de las principales barreras económicas para lograr la factibilidad del proceso. Debido al posicionamiento del bioetanol como bioenergético y el impacto económico que tiene el uso de enzimas altamente eficientes en este proceso. El presente tiene como objetivo establecer las mejores condiciones para la producción de celulasas de *Aspergillus niger* ITV-02 a partir de residuos lignocelulósicos. Los resultados obtenidos mostraron que el rastrojo de maíz fue el sustrato que produjo un extracto enzimático con mayor actividad celulolítica respecto a los otros sustratos probados (bagazo de caña, bagazo de sorgo, cáscara de arroz y paja de cebada), esto pudo deberse a que el rastrojo de maíz fue el sustrato que tuvo un mayor porcentaje de deslignificación (83%), lo que permitió que la estructura lignocelulósica fuera más porosa y accesible para *A. niger* ITV-02 favoreciendo la producción de celulasas. Al evaluar el efecto de la inoculación del microorganismo se encontró que las condiciones más favorables para la producción de celulasas fueron cuando se inocularon las esporas directamente al medio de fermentación y no con previa adaptación. De igual forma, el efecto de la concentración de sustrato a 10, 20 y 30 g/L mostró que la mejor producción de celulasas se logra con 10 g/L de rastrojo de maíz, 3.5 veces más que con 30 g/L. Finalmente se llevó a cabo la optimización de la producción de celulasas utilizando un modelo Box Behnken evaluando el efecto de la temperatura, el pH y la agitación, siendo la variable de respuesta la actividad celulasa total (FPU/mL). Las condiciones óptimas obtenidas fueron: 33°C, pH= 5.3 y 200 rpm, obteniendo un extracto enzimático con una actividad celulasa total de 0.215 FPU/mL, 1.6 veces más que el valor obtenido en la producción de celulasa antes de la optimización. Por lo que se concluye que *A. niger* ITV-02 es una cepa potencial para la producción de celulasas, utilizando un sustrato con alto contenido de celulosa y bajo contenido de lignina, como lo es rastrojo de maíz, el cual puede actuar como inductor para la producción de celulasas.

ABSTRACT

Miranda Sosa, Alejandra. M.S. Biochemical Engineering, Food Research and Development Unit, June, 2019. "Production of cellulases of *Aspergillus niger* ITV-02". Advisors: Aguilar Uscanga Ma. Guadalupe, del Moral Ventura Sandra T.

Cellulases are enzymes that hydrolyse (1→4)-β-D-glycosidic bonds of cellulose, lichenin and β-D-glucans, and so therefore they have a wide range of industrial purposes, such as in livestock feed, the textile and food industries and in second-generation bioethanol production. However, the high cost of cellulases is one of the main barriers to overcome to order to achieve economic feasibility of the bioethanol process. Due to the status of bioethanol as a bioenergetic and the economic impact of using highly efficient enzymes in this process, the aim of this work was to establish the best conditions to produce *Aspergillus niger* ITV-02 cellulases from lignocellulosic materials. The results show that corn stover was the lignocellulosic material that produced the highest cellulolytic activity compared to the other materials tested (sugarcane bagasse, sorghum bagasse, rice husk and barley straw). This was because corn stover had the highest delignification percentage (83%), which allowed the lignocellulosic structure to be more porous and accesible to *A. niger* ITV-02 thus benefiting cellulase production. Evaluation of the inoculation effect of the microorganism showed that the most favorable condition for cellulase production was when spores were inoculated directly into the fermentation medium without previous adaptation. Also, the effect of substrate concentration at 10, 20 and 30 g/L showed that the best cellulase production was achieved at 10 g/L with corn stover, 3.5 times more than with 30 g/L. Finally, cellulase production optimization was carried out using a Box Behnken model evaluating temperature, pH and agitation, response variable being total cellulase activity. The optimal conditions were: 33°C, pH =5.3 and 200 rpm, obtaining an enzyme extract with a total cellulase activity of 0.215 FPU/mL, 1.6 times more than values obtained in the cellulase production before optimization. Therefore, it was concluded that *A. niger* ITV-02 is a potential strain for cellulase production, using a substrate with high cellulose and low lignin contents.

CONTENIDO

| | |
|--|------|
| RESUMEN | v |
| ABSTRACT..... | vi |
| CONTENIDO | vii |
| LISTA DE TABLAS | x |
| LISTA DE FIGURAS..... | xi |
| LISTA DE ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA..... | xiii |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. ANTECEDENTES | 3 |
| 1.1 Enzimas | 3 |
| 1.2 Hidrolasas..... | 4 |
| 1.3 Celulasas | 5 |
| 1.3.1 Mecanismo de hidrólisis de celulosa..... | 6 |
| 1.3.2 Microorganismos productores de celulasas..... | 9 |
| 1.3.3 Uso de celulasas..... | 11 |
| 1.3.3.1 Uso de celulasas en la producción de bioetanol | 13 |
| 1.3.4 Celulasas comerciales | 14 |
| 1.4 Producción de celulasas | 16 |
| 1.4.1 Sistema de fermentación | 16 |
| 1.4.2 Sustrato | 20 |
| 1.4.2.1 Material lignocelulósico | 20 |
| 1.4.3 Condiciones fisicoquímicas | 22 |
| 1.4.3.1 Temperatura | 23 |
| 1.4.3.2 pH | 23 |

| | | |
|---------|---|----|
| 1.4.3.2 | Transferencia de masa | 23 |
| 1.5 | Antecedentes del grupo de trabajo | 24 |
| 2. | JUSTIFICACIÓN | 26 |
| 3. | OBJETIVOS | 27 |
| | OBJETIVO GENERAL | 27 |
| | OBJETIVOS ESPECIFICOS | 27 |
| 4. | MATERIALES Y MÉTODOS | 28 |
| 4.1. | Materia prima | 29 |
| 4.1.1 | Pretratamientos | 30 |
| 4.1.2 | Caracterización del material lignocelulósico | 30 |
| 4.2 | Material biológico | 32 |
| 4.2.1 | Cuenta celular | 32 |
| 4.3 | Medios de cultivo | 33 |
| 4.3.1 | Medio de conservación | 33 |
| 4.3.2 | Medio de fermentación | 33 |
| 4.4 | Obtención del extracto enzimático | 34 |
| 4.5 | Métodos para la medición de actividad enzimática celulasa | 35 |
| 4.5.1 | Método cualitativo por halo de actividad | 36 |
| 4.5.2 | Método de actividad celulasa total (FPasa) | 37 |
| 4.5.3 | Método de actividad Endo- β -1,4-glucanasa (CMCasa) | 38 |
| 4.5.4 | Método de actividad β -glucosidasa (BGL) | 39 |
| 4.6 | Evaluación del tipo de inóculo del microorganismo | 40 |
| 4.7 | Evaluación de la concentración de fuente de carbono | 40 |
| 4.8 | Optimización de la producción de celulasas | 41 |
| 5. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 43 |

| | |
|--|-----------|
| 5.1 Evaluación de diferentes materiales lignocelulósicos como sustrato.. | 43 |
| 5.1.1 Caracterización de los materiales lignocelulósicos crudos y pretratados | 43 |
| 5.1.2 Producción de celulasas con diferentes sustratos | 46 |
| 5.2 Efecto de del tipo de inoculación sobre la producción de celulasas | 51 |
| 5.2.1 Prueba cualitativa del tipo de inóculo (con y sin adaptación). | 52 |
| 5.2.2 Prueba cuantitativa del tipo de inóculo (con y sin adaptación)..... | 53 |
| 5.3 Evaluación de la concentración de sustrato | 56 |
| 5.3.1 Prueba cualitativa de extractos a diferentes concentraciones..... | 56 |
| 5.3.2 Prueba cuantitativa de extractos a diferentes concentraciones | 57 |
| 5.4 Optimización de la producción de celulasas..... | 59 |
| 6. CONCLUSIONES | 63 |
| 7. RECOMENDACIONES | 64 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA | 65 |
| 8. APÉNDICES | 72 |
| Apéndice A | 73 |

LISTA DE TABLAS

| | | Pág. |
|------------------|--|------|
| TABLA 1.1 | Clasificación enzimática en base a la IUBMB..... | 4 |
| TABLA 1.2 | Principales microorganismos productores de celulasas..... | 10 |
| TABLA 1.3 | Empresas que comercializan celulasas..... | 15 |
| TABLA 1.4 | Diferencias entre Fermentación Sumergida y Fermentación en Estado Sólido..... | 17 |
| TABLA 1.5 | Producción de celulasas por Fermentación en Estado Sólido | 19 |
| TABLA 1.6 | Pretratamientos realizados en materiales lignocelulósicos para la producción de celulasas..... | 22 |
| TABLA 1.7 | Identificación molecular de la cepa M2H10..... | 25 |
| TABLA 4.1 | Medio PDA para la conservación de la cepa..... | 33 |
| TABLA 4.2 | Medio de Mandels y Weber (1969) para la producción de celulasas..... | 34 |
| TABLA 4.3 | Medio para la actividad celulasa cualitativa..... | 36 |
| TABLA 4.4 | Medio de adaptación de <i>A. niger</i> ITV-02..... | 40 |
| TABLA 4.5 | Rango experimental y niveles de la producción de celulasas | 41 |
| TABLA 4.6 | Diseño Box-Behnken con valores codificados y reales..... | 42 |
| TABLA 5.1 | Composición lignocelulósica de los materiales crudos y pretratados..... | 44 |
| TABLA 5.2 | Prueba cualitativa con extractos de 120 h..... | 47 |
| TABLA 5.3 | Prueba cuantitativa con extracto de 120 h..... | 48 |
| TABLA 5.4 | Caracterización de los materiales residuales..... | 50 |
| TABLA 5.5 | Prueba cuantitativa del efecto del tipo de inóculo..... | 53 |
| TABLA 5.6 | Caracterización del RM residual..... | 54 |
| TABLA 5.7 | Efecto de la concentración de RM en la producción de celulasas..... | 57 |
| TABLA 5.8 | Resultados obtenidos de la optimización..... | 60 |

LISTA DE FIGURAS

| | | Pág. |
|-------------------|---|------|
| FIGURA 1.1 | Mecanismo de acción sinérgico de celulasas..... | 7 |
| FIGURA 1.2 | Efecto de la glucosa en la producción de celulasas..... | 8 |
| FIGURA 1.3 | Aplicaciones de las celulasas..... | 12 |
| FIGURA 1.4 | Proceso de producción de bioetanol..... | 13 |
| FIGURA 1.5 | Estructura de la celulosa del material lignocelulósico..... | 20 |
| FIGURA 1.6 | Determinación de azúcares reductores..... | 24 |
| FIGURA 1.7 | Efecto del tipo de sustrato en <i>A. niger</i> ITV-02..... | 25 |
| FIGURA 4.1 | Metodología general para la producción de celulasas de <i>A. niger</i> ITV-02..... | 28 |
| FIGURA 4.2 | Materiales lignocelulósicos crudos a utilizar como sustrato... | 29 |
| FIGURA 4.3 | Picadora y mallas..... | 30 |
| FIGURA 4.4 | Termobalanza Precisa XM 50 y Mufla Thermo Scientific FB1415M..... | 31 |
| FIGURA 4.5 | Cepa <i>A. niger</i> ITV-02 en conservación y esporas observadas al microscopio (40x)..... | 32 |
| FIGURA 4.6 | Centrífuga 5804 R Marca eppendorf..... | 35 |
| FIGURA 4.7 | Espectrofotómetro Thermo Spectronic Genesys 4001/4..... | 38 |
| FIGURA 5.1 | Estructura física de los materiales lignocelulósicos crudos y pretratados..... | 45 |
| FIGURA 5.2 | Halos de actividad producidos por <i>A. niger</i> ITV-02 en diferentes materiales lignocelulósicos..... | 46 |
| FIGURA 5.3 | Análisis estadístico de la prueba cualitativa de la evaluación de sustrato..... | 47 |
| FIGURA 5.4 | Gráficos de pruebas de diferencia significativa de las actividades enzimáticas con diferentes sustratos: a) CMCasa, b) FPasa y c) BGL con diferentes sustratos..... | 49 |

| | | |
|--------------------|--|----|
| FIGURA 5.5 | Consumo de azúcares en los diferentes sustratos..... | 51 |
| FIGURA 5.6 | Efecto del tipo de inóculo en la producción de celulasas (prueba cualitativa)..... | 52 |
| FIGURA 5.7 | Análisis estadístico de la prueba cualitativa del efecto del tipo de inóculo..... | 53 |
| FIGURA 5.8 | Consumo de a) Celulosa y b) Hemicelulosa con y sin adaptación de <i>A. niger</i> ITV-02..... | 55 |
| FIGURA 5.9 | Efecto de la concentración de RM en la producción de celulasas..... | 56 |
| FIGURA 5.10 | Gráficos de pruebas de diferencia significativa de las actividades: a) CMCasa, b) FPasa y c) BGL a diferentes concentraciones..... | 58 |
| FIGURA 5.11 | Superficie de respuesta de la actividad celulosa total..... | 61 |
| FIGURA 5.12 | Efecto de las variables sobre la FPasa..... | 62 |

LISTA DE ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA

| | |
|------------------------------------|---|
| AQ | Antraquinona |
| AOCS | American Oil Chemist' Society |
| atm | Atmósfera |
| BC | Bagazo de caña |
| BS | Bagazo de sorgo |
| BGL | Actividad β -glucosidasa |
| β-pNPG | <i>p</i> -Nitrofenil- β -glucopiranosido |
| °C | Grados celsius |
| CA | Cáscara de arroz |
| CBD | Cellulose binding domain |
| CD | Catalytic domain |
| cm | Centímetro |
| CMC | Carboximetilcelulosa |
| CMCasa | Actividad endo- β -1,4-glucanasa |
| CONACYT | Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología |
| DNS | 3,5-dinitrosalicílico |
| esp/mL | Esporas/mililitro |
| FPasa | Actividad celulasa total |
| FS | Fermentación sumergida |
| FES | Fermentación en estado sólido |
| g | Gramos |
| GH | Glycoside hydrolase |
| g/L | Gramos/litro |
| h | Hora |
| H₂O₂ | Peróxido de hidrógeno |
| H₂SO₄ | Ácido sulfúrico |
| INIFAP | Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias |

| | |
|--|---|
| IUBMB | International Union of Biochemistry and Molecular Biology |
| M | Molar |
| mg | Miligramo |
| mm | Milímetro |
| mM | Milimolar |
| mL | Mililitro |
| Na₃C₆H₅O₇ | Citrato de sodio |
| Na₂CO₃ | Carbonato de sodio |
| NaCl | Cloruro de sodio |
| NaOH | Hidróxido de sodio |
| nm | Nanómetros |
| NREL | National Renewable Energy Laboratory |
| P | Presión |
| PC | Paja de cebada |
| PDA | Papa/Dextrosa/Agar |
| pNP | <i>p</i> -Nitrofenol |
| p/v | Peso/volumen |
| RLS | Relación líquido-sólido |
| RM | Rastrojo de maíz |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SAGARPA | Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural |
| SO₂ | Dióxido de azufre |
| t | Tiempo |
| µg | Microgramos |
| µL | Microlitros |
| µM | Micromolar |
| µmol | Micromol |
| v/v | Volumen/volumen |

INTRODUCCIÓN

Las celulasas son enzimas capaces de hidrolizar material celulósico y tienen un uso variado en la industria, como, por ejemplo: en la producción de textiles, producción de detergentes, en la industria de pulpa y papel, en la producción de alimentos y actualmente en la producción de bioetanol de segunda generación, ya que son utilizadas para la sacarificación de la celulosa contenida en los residuos lignocelulósicos. Sin embargo, debido a la complejidad estructural *per se* de la celulosa para su sacarificación se requiere de un consorcio de enzimas celulasas y xilanasas, las cuales determinan la factibilidad económica del proceso por los altos costos de producción de éstas, limitando así su factibilidad a nivel industrial (Sukumaran, *et al.*, 2009; Phitsuwan, *et al.*, 2012; Zhang y Zhang, 2013; Juturu y Wu, 2014; Biswas, Persad y Bisaria, 2014).

La producción de estas enzimas ha sido ampliamente estudiada siendo los factores más importantes en el proceso de producción el microorganismo que se utilice (hongo o bacteria), las condiciones fisicoquímicas (temperatura, agitación y pH), el medio de cultivo el cual incluye fuente de carbono, fuente de nitrógeno y microelementos y el sistema de fermentación en el que se realice ya sea por fermentación sumergida o fermentación en estado sólido, donde la fermentación sumergida es la técnica más utilizada a nivel industrial (Acharya, *et al.*, 2008; Sohail, *et al.*, 2009; Machado, *et al.*, 2009; Singhanian, *et al.*, 2010; Akinyele y Olaniyi, 2013; Acevedo, Granados y Guerrero, 2014; Bettache, *et al.*, 2014).

Las celulasas pueden ser producidas por diferentes microorganismos como bacterias del género *Cellulomonas* y *Cytophaga* y hongos siendo los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, y *Penicillium* los más estudiados (Kuhad, *et al.*, 2011; Biswas, Persad y Bisaria, 2014; Panchapakesan y Shankar, 2016). Sin embargo, el género *Trichoderma* no secreta una de las celulasas necesarias para realizar la hidrólisis completa de la celulosa, característica que el género *Aspergillus* sí posee

debido a que es capaz de producir y excretar las tres celulasas (Suhag, Kumar y Singh, 2014; Patel, *et al.*, 2017; Singhania, *et al.*, 2017; Srivastava, *et al.*, 2017).

Debido al posicionamiento del bioetanol como bioenergético, el impacto de los biocombustibles de segunda generación y la importancia del uso de enzimas altamente eficientes, la propuesta de este trabajo fue establecer las mejores condiciones para la producción de celulasas de *Aspergillus niger* ITV-02 a partir de residuos lignocelulósicos. Para ello el trabajo fue dividido en tres etapas: I) la evaluación de diferentes sustratos lignocelulósicos pretratados, posteriormente II) se determinó el efecto del tipo de inoculación y la concentración de sustrato sobre la producción de celulasas y por último III) se realizó la optimización del proceso evaluando las variables de pH, temperatura y agitación; dichas etapas se encuentran descritas en el capítulo cuatro y sus resultados en el capítulo cinco.

1. ANTECEDENTES

1.1 Enzimas

De acuerdo con Teal y Wymer (1994), las enzimas son proteínas con función catalítica específica que son producidas por todo ser vivo. De manera común con otros catalizadores, son efectivas en pequeñas concentraciones, permanecen sin cambios después de la reacción y no afectan la posición de equilibrio de una reacción reversible, ya que disminuyen la energía de activación necesaria para que se lleve a cabo la reacción.

Debido a que estos biocatalizadores adquirieron importancia en la industria por sus múltiples beneficios, se comenzaron a desarrollar procesos biotecnológicos en los cuales se utilizaban grandes cantidades de estas proteínas y así mejorar sus rendimientos y productividades.

En 1955 la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) crea la Comisión Internacional de Enzimas con la finalidad de resolver los problemas de nombramiento de enzimas y así se creó la clasificación enzimática de acuerdo con la reacción que catalizan, como se observa en la Tabla 1.1.

El uso de enzimas se ha empleado desde tiempos pasados en la preservación de comida y bebidas, sin embargo, hoy en día su uso se ha expandido en la fabricación de textiles, fármacos, productos de limpieza y cada vez con mayor importancia en la industria biotecnológica debido a su uso en sistemas biológicos para la obtención de diversos productos de interés.

TABLA 1.1 Clasificación de las enzimas.

| No. Clase | Clase de enzima | Reacción |
|-----------|------------------|---|
| 1 | Oxidorreductasas | Catalizan reacciones de óxido-reducción |
| 2 | Transferasas | Transfieren un grupo de una molécula a otra. |
| 3 | Hidrolasas | Catalizan la hidrólisis de varios enlaces. |
| 4 | Liasas | Rompen enlaces C-C, C-O, C-N y otros enlaces por eliminación, dejando dobles enlaces o anillos, o de manera contraria, adicionan grupos a dobles enlaces. |
| 5 | Isomerasas | Catalizan cambios estructurales o geométricos dentro de una misma molécula. |
| 6 | Ligasas | Catalizan la unión de dos moléculas con la hidrólisis acoplada de un enlace difosfato en ATP o trifosfato similar. |

(Fuente: IUBMB)

Debido a esto se ha incrementado la demanda de enzimas más estables y específicas, reconociendo al grupo de las hidrolasas, como la clase de enzimas que tienen una mayor producción a nivel industrial, ya que estas juegan un papel importante en los procesos de bioconversión y biotransformación (Headon y Walsh, 1994; Bhat, 2000; Gurung, *et al.*, 2013; Soccol, *et al.*, 2014).

1.2 Hidrolasas

Las enzimas que pertenecen a este grupo catalizan la hidrólisis de diversos enlaces (IUBMB, s.f.). De acuerdo con su función, las enzimas hidrolasas con mayor uso en la industria son (Soccol, *et al.*, 2014; Pandey, *et al.*, 2017):

- *Amilasas*: Enzimas que catalizan la hidrólisis de moléculas de almidón o glucógeno, liberando diversos productos incluyendo dextrinas y

pequeños polímeros de glucosa. Se dividen en tres grupos: α -amilasa (3.2.1.1), β -amilasa (3.2.1.2) y glucoamilasa (3.2.1.3), cada una con mecanismo de acción diferente.

- *Fitasas*: Enzimas que catalizan la degradación catalítica del ácido fítico y liberar fosfato inorgánico (EC 3.1.3.8 y EC 3.1.3.26).
- *Pectinasas*: Enzimas que hidrolizan los enlaces pectinos que se encuentran en la pared celular de las plantas (3.2.1.15).
- *Lipasas*: Enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces éster por medio de una tríada catalítica, triacilglicerol lipasa (3.1.1.3), fosfolipasa (3.1.1.4) y lisofosfolipasa (3.1.1.4).
- *Proteasas*: Enzimas que catalizan enlaces peptídicos e intervienen en la función de la proteína (3.4).
- *Xilanasas*: Enzimas que hidrolizan xilano (presente en la hemicelulosa de las plantas) en azúcares monoméricos, incluyen a las enzimas endo-1,4- β -xilanasas (3.2.1.8) y β -xilosidasas (3.2.1.37).
- *Celulasas*: Enzimas que catalizan la hidrólisis de celulosa en monómeros de glucosa, consisten en tres enzimas endo-1,4- β -glucanasas (3.2.1.4), exoglucanasas (3.2.1.91) y β -glucosidasas (3.2.1.21).

1.3 Celulasas

Las celulasas son el grupo más prominente dentro de las enzimas hidrolíticas, estas catalizan enlaces β -1-4-glicosídicos presentes en la celulosa para obtener glucosa (Biswas, Persad y Bisaria, 2014) y pertenecen a la familia de las glicosil hidrolasas (GH, por sus siglas en inglés). Actualmente, la clasificación de las celulasas se basa en las propiedades estructurales de la enzima teniendo aproximadamente 133 familias GH, y la mayoría de estas tienen una estructura de dos dominios, donde uno representa el dominio de unión a celulosa (CBD, por sus siglas en inglés) y el otro es el dominio catalítico (CD, por sus siglas en inglés) (Juturu y Wu, 2014; Wilson, 2016; Panchapakesan y Shankar, 2016).

La completa degradación enzimática de los sustratos celulósicos depende de la producción de un sistema complejo de enzimas. Se lleva a cabo por la acción sinérgica de al menos tres clases de enzimas, las cuales en conjunto son llamadas celulasas o enzimas celulolíticas (Teal y Wymer, 1994; Sukumaran, *et al.*, 2005; Kuhad, *et al.*, 2011; Rani, *et al.*, 2016):

1. Endo-glucanasas (EG) (1,4- β -D-glucanohidrolasa; EC 3.2.1.4).
2. Exo-glucanasas o exo-celobiohidrolasas (CBH I y CBH II) (1,4- β -D-glucan glucohidrolasas; EC 3.2.1.74).
3. β -glucosidasas (BGL) (β -D-glucosida glucohidrolasas; EC 3.2.1.21).

1.3.1 Mecanismo de hidrólisis de celulosa

El mecanismo para la degradación completa de la celulosa tiene lugar en tres etapas (Wood y McCrae, 1979 citado en Karmakar y Ray, 2011), como se puede observar en la Figura 1.1:

1. La 1,4- β -D-glucanohidrolasa, endoglucanasa, o endocelulasa corta al azar enlaces β -(1,4) glucosídicos de la molécula de celulosa. Esta enzima permanece unida al sustrato y se deslizan a lo largo de cadena para seguir realizando cortes convirtiendo las cadenas largas en oligosacáridos como celobiosa o celodextrinas, creando nuevos extremos reductores.
2. La 1,4- β -D-glucanglucohidrolasas, exoglucanasa o exocelulosa actúa de forma progresiva en los extremos reductores (CBH I) y no reductores (CBH II) de la cadena, provocando la liberación de unidades de celobiosa y glucosa.
3. La β -glucosidasa es fundamental para lograr la completa hidrólisis de la celulosa ya que hidroliza la celobiosa liberada para formar monómeros de glucosa como producto final.

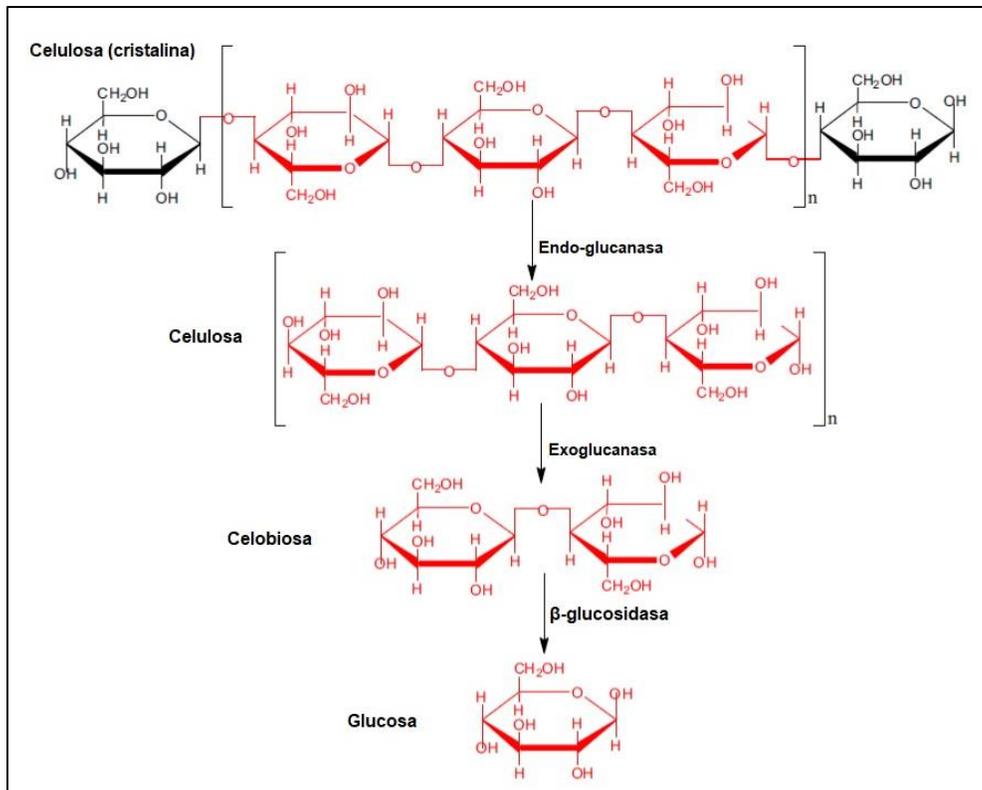


FIGURA 1.1 Mecanismo de acción sinérgico de celulasas (Juturu y Wu, 2014).

Se han realizado diversos estudios para establecer compuestos que actúen en la expresión de genes codificadores de enzimas GH en modelos de *T. reseei* y *A. niger*. Dentro de estos estudios se han identificado 200 genes que codifican para las GH, 2 de ellos codifican para las exoglucanasas, 7 para las endoglucanasas y 15 para las β -glucosidasas. Esta expresión es dirigida por inductores específicos como la celulosa o subproductos de esta, y es reprimida por diferentes reguladores (Gutiérrez-Rojas, Moreno-Sarmiento y Montoya, 2014).

El mecanismo de regulación genética para la producción de celulasas entre *T. reseei* y *A. niger* es muy diferente, mientras que *T. reseei* se induce por soforosa y celobiosa, *A. niger* se induce principalmente por xilano en una corregulación con las xilanasas (Mandels y Weber, 1969; Kubicek, 1987). Al actuar el xilano como inductor en el modelo de *A. niger*, el activador proteico *XInR* activa la transcripción de los genes *eglA* y *eglB* (endoglucanasas), *cbh1* y *cbh2* (exoglucanasas) y los genes del

sistema xilanolítico (*xlnA*, *xlnB*, *xlnC*, *xlnD* y *axeA*). Sin embargo, su eficiencia puede verse disminuida debido a la inhibición por la unión de cualquier compuesto inhibidor específico o por la represión catabólica (Rani, *et al.*, 2016).

En *A. niger*, la expresión de genes xilanolíticos y celulolíticos es fuertemente reprimida por glucosa, fructosa y xilosa en altas concentraciones. Esta represión es mediada principalmente por el regulador *creA* al detectar una concentración mínima de 70 mM de xilosa en el medio disminuyendo así los niveles de expresión (Gutiérrez-Rojas, Moreno-Sarmiento y Montoya, 2014).

Por otro lado, la represión catabólica es uno de los fenómenos más importantes en el proceso de producción de celulasas, en donde el producto final de la hidrólisis enzimática es el directo responsable de la regulación negativa a nivel transcripcional. Este mecanismo evita que el hongo sintetice una cantidad excesiva de celulasas cuando existe disponibilidad de otras fuentes más fácilmente asimilables ya que la glucosa al ser el producto final de la reacción va aumentando su concentración en el medio, lo que provoca que el microorganismo deje de sintetizar celulasas y comienza a consumir la glucosa para su crecimiento como se observa en la Figura 1.2, aumentando así su biomasa (Gutiérrez-Rojas, Moreno-Sarmiento y Montoya, 2014).

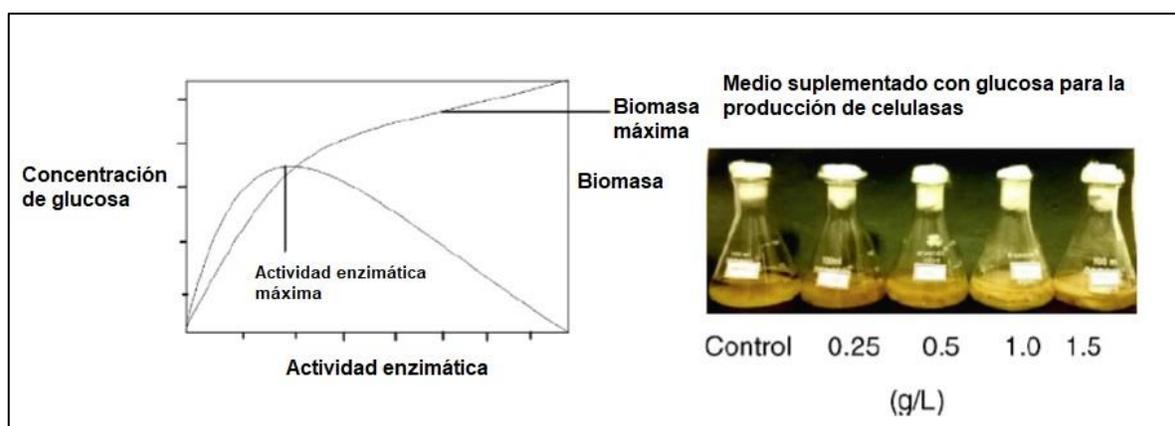


FIGURA 1.2 Efecto de la glucosa en la producción de celulasas (Rani, *et al.*, 2016).

Es por ello por lo que uno de los aspectos más importantes en la producción de estas enzimas es el microorganismo que se utilizara, ya que la regulación génica estará dada por este y debe de tener características específicas que sean favorables en el proceso, en el caso de *A. niger* debe presentar una alta tolerancia a concentraciones de glucosa y xilosa para no presentar una represión catabólica (Rani, *et al.*, 2016).

1.3.2 Microorganismos productores de celulasas

Las celulasas son principalmente producidas por hongos, bacterias y actinomicetos como se puede observar en la Tabla 1.2. Sin embargo, las celulasas producidas a partir de hongos son las más estudiadas debido a que los procesos de purificación son más sencillos y menos costosos, la actividad de las celulasas fúngicas es mayor que las celulasas bacterianas y pueden utilizar sustratos económicos como materiales lignocelulósicos, disminuyendo el costo total del proceso (Panchapakesan y Shankar, 2016).

Dentro del grupo de las bacterias, las más estudiados son los géneros *Clostridium* y *Bacillus* y en los hongos son los géneros *Trichoderma*, *Penicillium* y *Aspergillus*, ya que son los microorganismos que producen celulasas con alta actividad enzimática.

La mayoría de las celulasas que se producen a nivel industrial se producen a partir de hongos del género *Trichoderma* y en particular la especie *reesei* que ha sido evaluada con tecnología de ADN recombinante para realizar modificaciones genéticas que permitan altos rendimientos de producción. Sin embargo, este género presenta la desventaja de producir cantidades limitadas de β -glucosidasa lo que disminuye la actividad celulasa total.

TABLA 1.2 Principales microorganismos productores de celulasas.

| Microorganismo | Género | Especie | Referencia |
|------------------|---------------------|---------------------------|--|
| Hongos | <i>Aspergillus</i> | <i>A. niger</i> | Haq, et al., 2006; Mrudula y Murugammal, 2010; Akinyele y Olaniyi 2013 |
| | | <i>A. nidulans</i> | Jecu, 1999 |
| | | <i>A. sydowii</i> | Matkar, et al., 2013 |
| | | <i>A. hortai</i> | El-Hadi, et al., 2014 |
| | | <i>A. ficuum</i> | Torres, 2009 |
| | <i>Fusarium</i> | <i>F. solani</i> | Wood y McCrae, 1977 |
| | | <i>F. oxysporum</i> | Panagiotou, et al. 2003; Ramanathan, Banupriya y Abirami, 2010 |
| | <i>Melanocarpus</i> | <i>M. albomyces</i> | Oinonen, A. et al., 2004 |
| | <i>Penicillium</i> | <i>P. funiculosum</i> | Machado, et al., 2009 Nobuyuki, et al., 2012 |
| | | <i>P. echinulatum</i> | Camassola y Dillon, 2007 |
| | | <i>P. janthinellum</i> | Adsul, et al., 2005 |
| | <i>Trichoderma</i> | <i>T. reesei</i> | Kumar, et al., 2008; |
| | | <i>T. longibrachiatum</i> | Acevedo, Granados y Guerrero, 2014 |
| <i>T. viride</i> | | Rodríguez y Piñeros, 2007 | |
| Bacterias | <i>Acidothermus</i> | <i>A. Cellulolyticus</i> | Tucker, et al., 1989 |
| | <i>Bacillus</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | Heck, et al., 2002 |
| | <i>Clostridium</i> | <i>C. acetobutylicum</i> | López, et al., 2004 |
| | | <i>C. thremocellum</i> | Nochure, Roberts y Demain, 1993 |

Fuente: (Modificado de Kuhad, et al., 2011)

Por otro lado, se ha reportado que el género *Aspergillus* es capaz de producir las tres celulasas en altas cantidades para llevar a cabo su acción sinérgica (Akinyele y Olaniyi, 2013; Panchapakesan y Shankar, 2016), por lo que representa un microorganismo potencial para la producción de estas enzimas. Debido a que *Trichoderma* y *Aspergillus* han demostrado ventajas técnicas en comparación contra otros microorganismos, se han realizado investigaciones utilizando co-cultivos y así obtener extractos enzimáticos con mayor actividad (Haq, *et al.*, 2006; Ahamed y Vermette, 2008).

1.3.3 Uso de celulasas

Son las segundas enzimas con mayor demanda a nivel industrial y con mayor aporte económico debido a la gran demanda que tienen por sus diferentes usos (Figura 1.3) por ejemplo (Tolan y Foody, 1999; Bhat, 2000; Kuhad, *et al.*, 2011; Singhanian, *et al.*, 2017):

- Industria Textil: se utilizan para degradar las fibras de la superficie (fibras sueltas y microfibrillas) haciendo a los tejidos más lisos y blandos.
- Detergentes: le dan una acción de limpieza mayor sin dañar las prendas de vestir y ayuda a remover las partículas de algodón que suelen quedarse adheridas después de repetidos lavados.
- Alimentos: mejora la extracción y clarificación de jugos de frutas y verduras. También mejora la textura y calidad de los productos de panadería, entre otros usos.
- Industria de la cerveza y vino: su uso está enfocado en el mejoramiento de la calidad y el rendimiento del producto, así como en la extracción de color del vino.
- Comida para ganado: mejora la calidad nutricional de los alimentos utilizados para el ganado y su digestión, reduciendo costos de alimentación.

- Industria de pulpa y papel: se utilizan en la eliminación de la tinta y agua, así como coaditivo en el proceso de blanqueamiento.
- Agricultura: son utilizadas por su capacidad de degradar la pared celular de patógenos de las plantas en el control de enfermedades de las plantas. También son utilizadas para la mejora de la calidad del suelo.
- Biocombustible: se utiliza en la conversión de materiales lignocelulósicos en alcohol, el cual puede ser utilizado como combustible, actualmente aún se siguen realizando mejoras en la optimización del proceso.



FIGURA 1.3 Aplicaciones de las celulasas en la industria.

Hoy en día, las celulasas han cobrado importancia debido a su uso en la producción de bioetanol de segunda generación, un biocombustible alternativo al uso de combustibles fósiles. El bioetanol muestra características favorables ambientales y económicas, sin embargo, su proceso de producción todavía no cuenta con la factibilidad necesaria para desarrollarse a nivel industrial.

1.3.3.1 Uso de celulasas en la producción de bioetanol

El proceso de producción de bioetanol de segunda generación consta de varias etapas: pretratamiento, sacarificación, fermentación, destilación y deshidratación, siendo el producto final etanol con 99.5% de pureza el cual puede ser utilizado como biocombustible.

En este proceso se utiliza material lignocelulósico como materia prima, la cual está formada en su mayoría por celulosa (38-45%), hemicelulosa (15-30%) y lignina (12-25%). Siendo la celulosa el polisacárido de mayor interés, debido al contenido de glucosa la cual posteriormente se convertirá en etanol (Figura 1.4). Para llevar la sacarificación o hidrólisis enzimática se utilizan celulasas. Sin embargo, esta etapa del es el principal obstáculo económico para la factibilidad del proceso de producción de bioetanol de segunda generación debido a los altos costos de las celulasas y su baja disponibilidad.

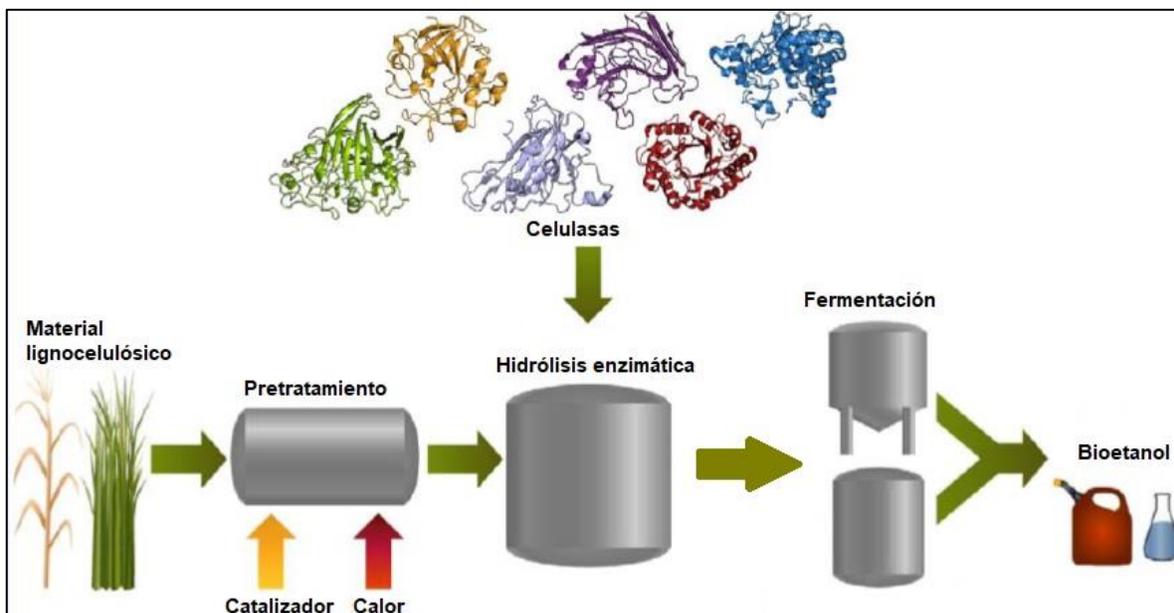


FIGURA 1.4 Proceso de producción de bioetanol (Modificado de Payne, *et al.*, 2014)

En la actualidad, hay plantas pioneras en la producción de bioetanol de segunda generación como las de DuPont, Abengoa y POET/DSM las cuales utilizan rastrojo de maíz como sustrato, y han permitido evaluar los costos y la operabilidad de la planta en base a la experiencia y no con proyecciones y de esta forma realizar reducciones de costo en el proceso (Lynd, *et al.*, 2017).

Sin embargo, se ha establecido que para llevar este proceso a escala industrial es necesario desarrollar modificaciones y mejoras en el proceso de conversión de celulosa (Srivastava, *et al.*, 2017), y de acuerdo con lo reportado por Klein-Marcuschamer, *et al.*, (2011) mediante una evaluación económica con diferentes escenarios donde el promedio del costo de enzimas en la producción de bioetanol de segunda generación es de 1.05 dólares/galón, determinaron que disminuir la carga enzimática sería la solución para reducir el costo total del proceso así como los pretratamientos realizados para poder llevar a cabo la conversión de una manera óptima.

1.3.4 Celulasas comerciales

Las principales empresas que se dedican a la producción y distribución de celulasas son Novozymes y DuPont, quienes han adquirido a lo largo de los años diversas empresas medianas dedicadas a la producción de enzimas como Danisco y Genencor. Estas empresas se han enfocado en desarrollar diversos complejos enzimáticos (Tabla 1.3) con mayor actividad, produciéndolos a partir de hongos del género *Trichoderma* modificados genéticamente de esta forma han incrementado la producción proteica a bajos costos.

Cabe señalar que el mercado comercial se encuentra monopolizado por estas dos empresas extranjeras, las cuales determinan la disponibilidad y por ende el costo final de estas enzimas. Por lo que la producción de celulasas es un tema de interés en el proceso de producción de bioetanol de segunda generación.

TABLA 1.3 Empresas que comercializan celulasas.

| Empresa | Producto | Microorganismo |
|-------------------------------------|---------------------|--|
| Worthington Biochemical Corporation | Celulasa 250 | <i>Trichoderma reesei</i> ATCC26921 |
| BioReagent | Celulasas | <i>Trichoderma sp.</i> |
| Novozymes® | Celluclast® 1.5L | <i>Trichoderma reesei</i> y <i>Aspergillus niger</i> |
| | Cellic CTec2 | <i>Trichoderma reesei</i> |
| | Cellic Ctec3 | <i>Trichoderma sp.</i> |
| | Viscozyme® L | <i>Aspergillus sp</i> |
| | Ultraflo L | <i>Trichoderma longibrachiatum</i> y <i>Trichoderma reesei</i> |
| | Energex L | <i>Trichoderma longibrachiatum</i> y <i>Trichoderma reesei</i> |
| Danisco | Cellulase 2000L | <i>Aspergillus niger</i> |
| GENENCOR® | Multifect CL | <i>Trichoderma longibrachiatum</i> y <i>Trichoderma reesei</i> |
| | Bio-Feed Beta L | <i>Trichoderma reesei</i> |
| | Spezyme CP | <i>Trichoderma longibrachiatum</i> y <i>Trichoderma reesei</i> |
| | GC 220 | <i>Trichoderma longibrachiatum</i> y <i>Trichoderma reesei</i> |
| | Cellulase AP30K | <i>Trichoderma reesei</i> |
| IOGEN® | Ultra-Low Microbial | <i>Trichoderma longibrachiatum</i> y <i>Trichoderma reesei</i> |
| DuPont® | OPTIMASH | <i>Penicillium funiculosum</i> |
| | ACCELLERASE | <i>Trichoderma reesei</i> |

Fuente: Modificado de Singhanian et al. (2017)

1.4 Producción de celulasas

La producción de celulasas es influenciada por diversos factores: el microorganismo que se utiliza, las condiciones fisicoquímicas (temperatura, pH y agitación), el medio de cultivo (orgánico o sintético) y el sistema de fermentación en el que se llevará a cabo.

1.4.1 Sistema de fermentación

Aunque los procedimientos específicos adoptados por los diferentes fabricantes pueden variar, para la producción de celulasas existen dos principales son: Fermentación Sumergida (FS) y Fermentación en Estado Sólido (FES) (Lambert, *et al.*, 1983).

La FS se define como una fermentación donde el microorganismo y el sustrato está presentes en un medio líquido, con una gran cantidad de solvente (Rao, 2010). Algunas ventajas que tiene la FS son la facilidad de operación y manejo de producto, además de la posibilidad de controlar fácilmente los factores ambientales como la temperatura, pH y aireación, manteniendo el medio de crecimiento estable. Una ventaja adicional de esta técnica es que la purificación de los productos es más fácil (Papagianni, 2017). Este sistema de fermentación es el más utilizado a escala industrial y el más estudiado debido a las ventajas técnicas que tiene contra la FES (Tabla 1.4)

TABLA 1.4 Diferencias entre Fermentación Sumergida y Fermentación en Estado Sólido.

| Variable | FS | FES |
|----------------------------|--|---|
| Sustrato | Sólido soluble | Polímero insoluble: Materiales lignocelulósicos, |
| Agua | Gran consumo de agua | Limitado consumo de agua, baja actividad de agua. |
| Control de temperatura | Fácil control de temperatura | Difícil control de temperatura |
| Control pH | Fácil control de pH | Sustrato sólido amortiguado |
| Escalado | Equipos industriales disponibles | Requiere del diseño de ingeniería |
| Consideraciones de energía | Considerable consumo de energía | Poco consumo energético |
| Agitación mecánica | Buena homogenización | Mezclado deficiente |
| Volumen de equipo | Gran volumen y alto costo tecnológico | Bajo volumen y bajo costo tecnológico |
| Contaminación | Riesgo de contaminación por una cepa bacteriana. | Riesgo de contaminación por bajo crecimiento del hongo. |
| Efluente/Contaminación | Grandes cantidades de efluentes contaminantes. | No hay efluentes. |
| Productos/Concentración | 30-80 g/L | 100/300 g/L |

Fuente: Bettache, *et al.*, 2014

La FES es definida como un proceso de fermentación en donde el microorganismo crece en material sólido sin la presencia de líquido (Krishna, 2005), sin embargo, se el sustrato que se utilice debe tener suficiente humedad para promover el crecimiento y la actividad metabólica del microorganismo (Suhag, *et al.*, 2014; Patel *et al.*, 2017), de lo contrario no habrá un rendimiento adecuado del proceso.

Hay numerosas investigaciones sobre la FES utilizando materiales lignocelulósicos como sustrato, donde concluyen que se obtienen celulasas con mayor actividad celulolítica en comparación con las obtenidas con FS (Tabla 1.5). Sin embargo, este sistema de fermentación aun cuenta con dificultades técnicas para llevarlo a escala industrial, como el difícil control de los parámetros fisicoquímicos y la esterilidad del proceso (Tolan y Foody, 1999; Jecu, 1999; Kumar, *et al.*, 2008; Singhania, *et al.*, 2010; Bettache, *et al.*, 2014; Mendes, *et al.*, 2016).

TABLA 1.5 Producción de celulasas por Fermentación en Estado Sólido.

| Sustrato | Microorganismo | Inóculo | Referencia |
|--|---|-------------------------------|---------------------------------|
| Salvado de trigo, paja de trigo, rastrojo de maíz, paja de colza, paja de junco y bagazo de caña de azúcar | <i>Aspergillus terreus</i> M11 | 10 ⁶ esp/mL | Gao, <i>et al.</i> , 2008 |
| Torta de canola y pomaza | <i>Aspergillus ficuum</i> DSM 932 | 4.36 x 10 ⁷ esp/mL | Torres, 2009 |
| Residuos de cultivo de plátano | <i>Pleurotus ostreatus</i> var. <i>Florida</i> <i>Pleurotus pulmonarius</i> N. 20 <i>Lentinula edodes</i> | Semilla grano de trigo | Paredes, <i>et al.</i> , 2010 |
| Residuos de bonote (cáscara de coco) | <i>Aspergillus niger</i> | N/A | Mrudula y Murugammal, 2010 |
| Salvado de trigo y cascara de soja | <i>Aspergillus oryzae</i> | 10 mL de activación | Brijwani, Singh y Vadlani, 2009 |
| Aserrín, mazorca de maíz y salvado de trigo | <i>Aspergillus</i> , <i>Trichoderma</i> y <i>Penicillium</i> | N/A | Patel, <i>et al.</i> , 2017 |

Se observa que las condiciones de trabajo son distintas entre ambos procesos, por lo que es importante evaluarlos individualmente para conocer las limitantes y los beneficios que cada uno puede generar dependiendo del tipo de microorganismo que se utilice, así como de las condiciones adecuadas para el desarrollo de este y la producción de la enzima.

1.4.2 Sustrato

Se ha determinado que la expresión de las celulasas está controlada principalmente por la fuente de carbono, donde diversos estudios han reportado que el uso de material lignocelulósico beneficia su producción, según Adsul, *et al.*, 2005, Juhász, *et al.* (2005), Martínez-Anaya, *et al.* (2008), Matkar, *et al.* (2013), Akinyele y Olaniyi (2013) y Singhanía, *et al.* (2017).

1.4.2.1 Material lignocelulósico

El material lignocelulósico está compuesto por celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina y otros compuestos inorgánicos (Figura 1.5) y se considera el material orgánico más abundante teniendo su mayor fracción en los residuos agroindustriales (bagazo de caña, sorgo y agave, cascarilla de café y cáscara de diversas frutas), residuos agrícolas (rastrajo y olote de maíz, paja de cebada y trigo y cascarilla de arroz) y residuos forestales (aserrín y residuos de madera) principalmente (Rajendran y Taherzadeh, 2014).

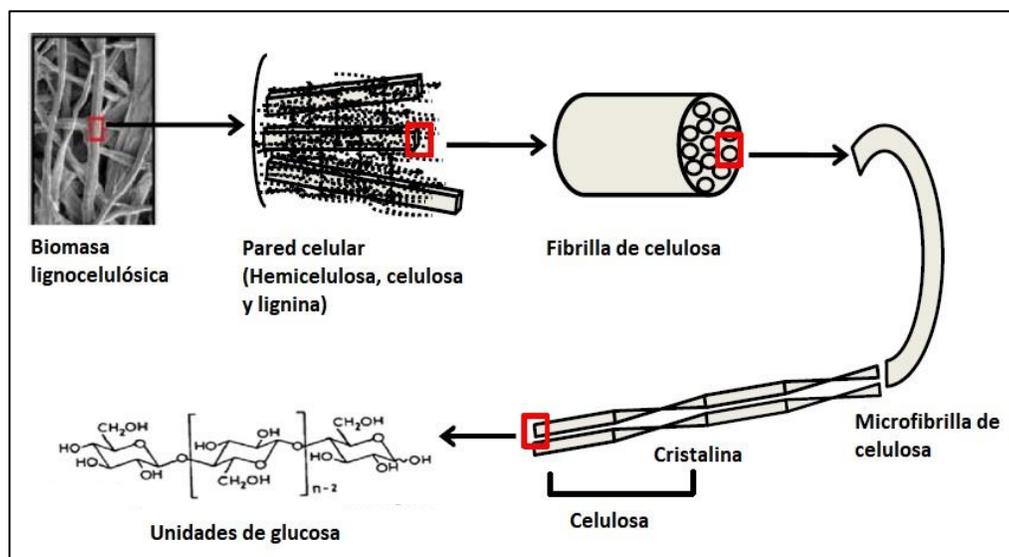


FIGURA 1.5 Estructura de la celulosa del material lignocelulósico (Kuhad, *et al.*, 2015)

Sin embargo, la estructura del material lignocelulósico es compleja, lo que dificulta la obtención de los azúcares presentes. La lignina representa el mayor obstáculo para el uso de estos materiales en procesos biotecnológicos, por lo que es necesario realizar pretratamientos cuyo objetivo es remover la remoción parcial de la lignina y la hemicelulosa. De esta forma se reduce la estructura cristalina de la celulosa y se aumenta la porosidad de ésta. Para ello se han desarrollado diversos pretratamientos (físicos, químicos y biológicos), pero para elegir cual debe utilizarse, es necesario evaluar su eficiencia, el consumo de energía, tiempo y los riesgos ambientales, con la finalidad de obtener un proceso factible económica y ambientalmente (Kumar, *et al.*, 2009; Nobuyuki, *et al.*, 2013; Rajendran y Taherzadeh, 2014).

En la Tabla 1.6 se enumeran diversas investigaciones en la producción de celulasas y los diferentes pretratamientos realizados sobre el material lignocelulósico, donde se concluye que el pretratamiento debe ser altamente eficiente sin realizar modificaciones significativas en el contenido de hemicelulosa y celulosa presente, ya que puede disminuir la producción de las enzimas debido a que la estructura remanente permite la unión enzima-sustrato (Adsul, *et al.*, 2005). De igual forma, estas investigaciones muestran la importancia de la remoción de lignina y el contenido celulosa final que tiene el material lignocelulósico.

TABLA 1.6 Pretratamientos realizados en materiales lignocelulósicos para la producción de celulasas.

| Sustrato | Pretratamiento | Remoción de lignina (%) | Referencia |
|--------------------------|---|-------------------------|--------------------------------|
| Bagazo de caña de azúcar | Molienda y tamizado Tamaño de partícula 1-10 mm Hidrólisis alcalina Solución de NaOH (16% v/v), H ₂ SO ₄ (0.3% v/v) y AQ (0.2% v/v), 120°C, 20 min RLS 1:1 | N/R | Camassola y Dillon, 2007 |
| Bagazo de caña de azúcar | Blanqueamiento NaClO ₂ 70°C, 4 h, RLS 0.25:1 | 60 | Acharya, <i>et al.</i> , 2008 |
| Aserrín | Hidrólisis alcalina NaOH 2 N, T=ambiente, 12 h | N/R | Juhasz, <i>et al.</i> , 2008 |
| Paja de arroz | Hidrólisis ácida H ₂ SO ₄ (2.5% p/v), 152°C, 20 min, RLS 10:1 | N/R | Kandari, <i>et al.</i> , 2013 |
| Bagazo de caña de azúcar | Hidrólisis ácida H ₂ SO ₄ (1% v/v), 121°C, 45 min, RLS 2:1 Hidrólisis alcalina NaOH (4% p/v), 121°C, 30 min, RLS 20:1 | 52 | Nobuyuki, <i>et al.</i> , 2013 |

N/R= No reportado

1.4.3 Condiciones fisicoquímicas

La temperatura, pH y agitación son los parámetros físicos más importantes que influyen sobre el crecimiento y el desarrollo del metabolismo del microorganismo en una FS. A continuación, se describe el efecto de estas condiciones en la producción de celulasas:

1.4.3.1 Temperatura

La temperatura a la cual se lleva a cabo el proceso de producción de celulasas influye en el metabolismo del microorganismo. De acuerdo con lo reportado con Juhász, *et al.* (2005), Sohail, *et al.* (2009), Matkar, *et al.* (2013), Akinyele y Olaniyi (2013) y Faheina, *et al.* (2015), la temperatura óptima para la producción de celulasas a partir del género *Aspergillus* se encuentra en el rango 30-40°C dependiendo de la especie.

1.4.3.2 pH

El pH es la medida de acidez o alcalinidad que tiene una solución y en diversos estudios es el factor que más influye en la producción de celulasas, lo que podría deberse a que la morfología del microorganismo está influenciada por este. Para la mayoría de los microorganismos del género *Aspergillus* el pH óptimo varía según su especie, en *A. niger* el rango se encuentra entre 4.0 y 6.0 (Acharya, *et al.*, 2008; Matkar, *et al.*, 2012).

1.4.3.2 Transferencia de masa

La transferencia de masa en una fermentación se ve afectada por la intensidad de agitación, la cual debe ser regulada para brindar los requerimientos necesarios de oxígeno disuelto. Debido a que se ha demostrado que la morfología del hongo puede cambiar a diferentes velocidades de agitación, así como influir en la producción de enzimas, es necesario conocer el rango en el cual el microorganismo obtenga el oxígeno disuelto necesario para producir celulasas. Las condiciones son específicas para cada cepa, sin embargo, en diversos estudios se ha establecido para *A. niger* un rango de 100 a 200 rpm para la producción de celulasas con una alta actividad (Cunha, *et al.*, 2012; Kandari, *et al.*, 2013).

1.5 Antecedentes del grupo de trabajo

La cepa *A. niger* ITV-02 fue aislada a partir de una muestra de la corteza de un árbol por Reyes (2015) en el Laboratorio de Bioingeniería de la Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos. Se aislaron en total 96 cepas, de las cuales 47 hidrolizaban celulosa y 46 xilano y mediante pruebas cualitativas y cuantitativas determinó su capacidad para secretar enzimas celulolíticas (Figura 1.6) donde se observó que la cepa M2H10 libera una mayor concentración de azúcares reductores.

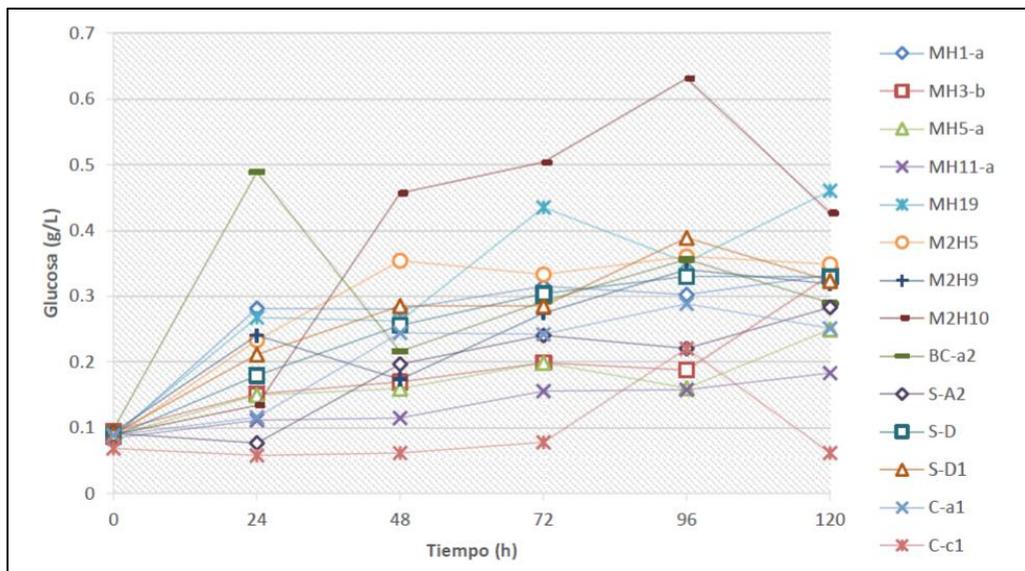


FIGURA 1.6 Determinación de azúcares reductores (Reyes, 2015).

Posteriormente, la cepa M2H10 fue identificada molecularmente y analizada con el programa BLASTn (NCBI) encontrándose que está relacionada con *Aspergillus niger* como se observa en la Tabla 1.7. Por lo que fue nombrada para investigaciones posteriores *Aspergillus niger* ITV-02.

TABLA 1.7 Identificación molecular de la cepa M2H10.

| Aislado | Best hit | Cobertura (%) | Identidad (%) | No. de acceso NCBI |
|---------|--|---------------|---------------|--------------------|
| M2H10 | <i>Aspergillus niger</i> 01NT.1.5.4 | 96 | 99 | MH095994.1 |

Por otro lado, Infanzón (2019) realizó pruebas cualitativas y cuantitativas evaluando la producción de celulasas de *A. niger* ITV-02 en diferentes sustratos: carboximetilcelulosa, bagazo de sorgo deslignificado y celulosa de bagazo de sorgo. Los resultados muestran (Figura 1.7) que el bagazo de sorgo deslignificado es el sustrato que produce un mayor halo de actividad celulolítica.

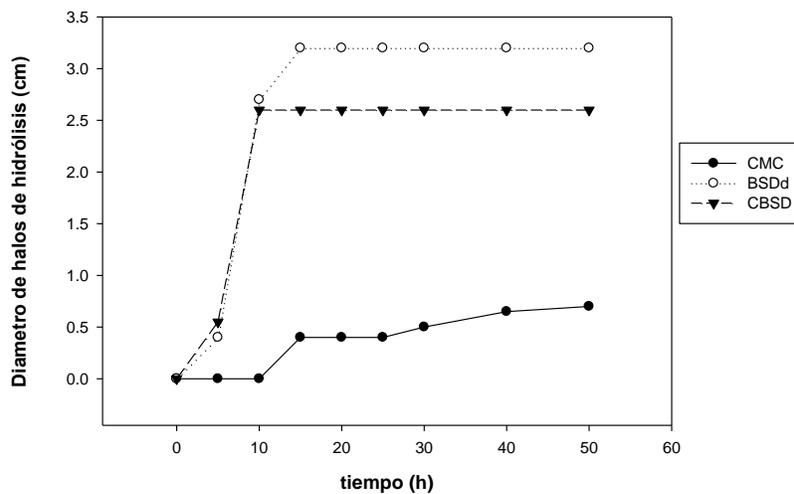


FIGURA 1.7. Efecto del tipo de sustrato en *A. niger* ITV-02.

Por lo que determinó que el bagazo de sorgo deslignificado es el sustrato que brinda un extracto con mayor actividad cuantificando la actividad endo-glucanasa y β -glucosidasa del extracto obteniendo 0.556 y 1.31 U/mL respectivamente con *A. niger* ITV-02, demostrando que es un hongo con potencial para la producción de celulasas utilizando material lignocelulósico como sustrato.

2. JUSTIFICACIÓN

Debido su baja disponibilidad y a los altos costos de producción, las celulasas son enzimas hidrolíticas que impactan en gran medida en el costo de producción de etanol de segunda generación.

Se ha reportado que el género *Aspergillus* presenta diversas ventajas ante otros géneros como el producir los tres tipos de celulasas y en mayor cantidad las β -glucosidasas las cuales son responsables de regular la expresión de estas proteínas al hidrolizar celobiosa en monómeros de glucosa y así, mantener un nivel adecuado para evitar la represión catabólica.

La producción de enzimas a partir de residuos lignocelulósicos puede brindar ventajas técnicas y económicas a nivel industrial debido a que la materia prima es renovable y de bajo costo.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Establecer las mejores condiciones para la producción de celulasas de *Aspergillus niger* ITV-02.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar el efecto de diferentes sustratos sobre la producción de celulasas.
- Determinar el efecto del tipo de inoculación de *A. niger* ITV-02 sobre la producción de celulasas.
- Evaluar el efecto de la concentración de sustrato sobre la producción de celulasas.
- Optimizar la producción de celulasas en términos de temperatura, pH y agitación.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Para evaluar las variables involucradas en el proceso de producción de celulasas y poder establecer las mejores condiciones se siguió la metodología general como se muestra en la Figura 4.1.

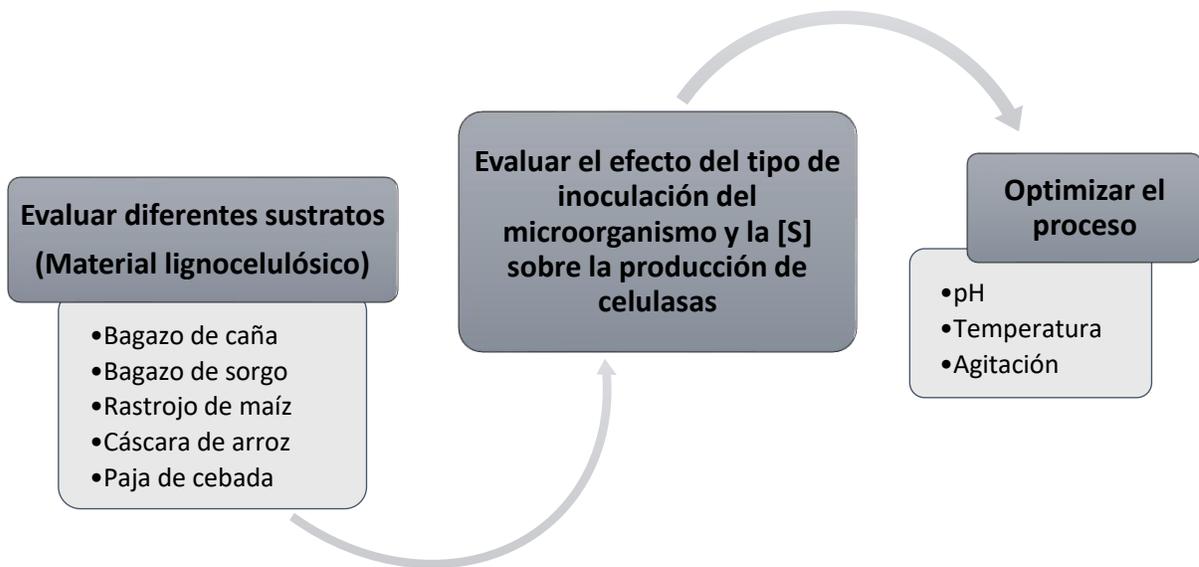


FIGURA 4.1 Metodología general para la producción de celulasas de *A. niger* ITV-02.

Mediante la metodología general descrita en la Figura 4.1 se acoplaron los objetivos específicos de este trabajo logrando obtener las mejores condiciones de producción de celulasas en función al tipo de sustrato, fase de crecimiento del microorganismo, la concentración de sustrato y condiciones tales como temperatura, pH y agitación.

4.1. Materia prima

Los materiales lignocelulósicos para evaluar como sustrato para la obtención de celulasas fueron bagazo de caña (BC), bagazo de sorgo (BS), rastrojo de maíz (RM), cáscara de arroz (CA) y paja de cebada (PC) (Figura 4.2), los primeros cuatro fueron suministrados por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) zona Golfo-Centro. Los residuos mencionados fueron identificados como cultivos que ofrecen alta disponibilidad después de la cosecha (tallos y hojas) o del proceso industrial dentro del proyecto CONACYT-SAGARPA No. 2017-03-291143 titulado “Producción de bioetanol de 2° generación a partir de residuos agroindustriales y enzimas obtenidas de microorganismos autóctonos”. La PC se recolectó en Tlanalapa, Hidalgo siendo de la variedad “Doña Josefa”. Todas las muestras fueron almacenadas en sacos a temperatura ambiente para su posterior uso.



FIGURA 4.2 Materiales lignocelulósicos crudos a utilizar como sustrato.

4.1.1 Pretratamientos

El primer pretratamiento que se realizó fue mecánico para disminuir el tamaño de partícula mediante una picadora (Figura 4.3.) la cual tenía dos mallas: 1 de 1 cm y 1 de ½ cm. Posteriormente se realizó un pretratamiento químico, hidrólisis alcalina, para remover el mayor porcentaje de lignina y de esta forma romper los enlaces de hidrógeno presentes en la forma cristalina de la celulosa y obtener una estructura amorfa final que permita un acceso a los azúcares con mayor facilidad.

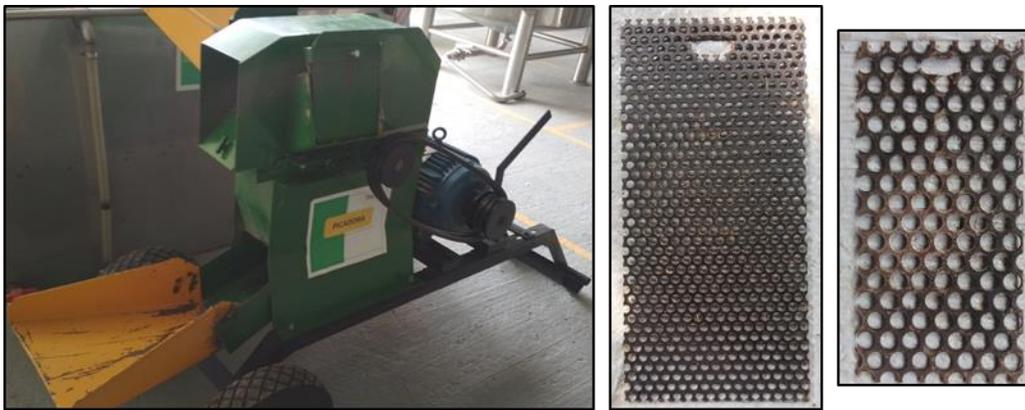


FIGURA 4.3 Picadora y mallas.

La hidrólisis alcalina se llevó a cabo con las condiciones óptimas establecidas por Moran (2018) para el bagazo de caña ($H_2O_2=6\%$, $RLS=10:1$ y $t=37$ h) ajustando a un pH de 11.5 con NaOH 10 M dejándose a temperatura ambiente. Estas condiciones se repitieron para todos los materiales lignocelulósicos.

4.1.2 Caracterización del material lignocelulósico

Para obtener la composición lignocelulósica previa y posterior del pretratamiento se llevó a cabo la metodología propuesta por el Laboratorio Nacional de Energías Renovables (NREL por sus siglas en inglés) en el reporte técnico NREL/TP-510-

42618 “Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass”, la cual establece los métodos analíticos estándar para la biomasa.

La humedad se obtuvo mediante los datos arrojados por la termobalanza Precisa XM 50 (Figura 4.4.) en el cual se colocó 1 gramo de la muestra realizando una cinética de secado por 30 minutos y pasado el tiempo arroja el porcentaje de humedad final. Para la cuantificación de cenizas se realizó el método propuesto por la Sociedad Americana de Químicos Petroleros (AOCS por sus siglas en inglés) AOCS Ba 5^a-49 en el cual se pesaron 2 gramos de muestra los cuales se colocaron en un crisol de porcelana previamente pesado y se llevó a la mufla Thermo Scientific FB1415M (Figura 4.4.), a 550°C por 2 horas. Terminado el ciclo se sacó el crisol y se dejó enfriar en un desecador para posteriormente pesarlo. La ecuación para obtener el porcentaje de cenizas es (4.1):

$$\% \text{ cenizas} = \frac{\text{peso de cenizas (g)}}{\text{peso inicial de la muestra (g)}} * 100 \quad (4.1)$$



FIGURA 4.4. Termobalanza Precisa XM 50 y Mufla Thermo Scientific FB1415M.

Al realizar la caracterización completa de los materiales crudos y pretratados se puede obtener el porcentaje de remoción de lignina con la ecuación siguiente (4.2):

$$\% \text{ remoción lignina} = 100 - \left(\frac{\% \text{ lignina final} * 100}{\% \text{ lignina inicial}} \right) \quad (4.2)$$

4.2 Material biológico

La cepa *A. niger* ITV-02 forma parte del cepario del Laboratorio de Bioingeniería de la Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz

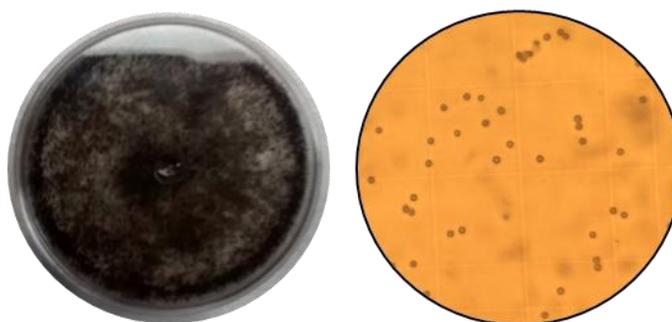


FIGURA 4.5 Cepa *A. niger* ITV-02 en conservación y esporas observadas al microscopio (40x).

4.2.1 Cuenta celular

Para obtener las esporas se realizó un arrastre de esporas con Tween 80 al 0.1% (v/v) y posteriormente se realizó su conteo utilizando una cámara de Thoma (Apéndice A):

4.3 Medios de cultivo

4.3.1 Medio de conservación

La cepa se conservó en medio PDA (Tabla 4.1) en el cual se dejó crecer por 6 días a 30°C para su posterior refrigeración a 4°C, con resiembras cada 30 días.

TABLA 4.1 Medio PDA para la conservación de la cepa.

| Componente | Concentración (g/L) |
|----------------------|----------------------------|
| Extracto de levadura | 10 |
| Peptona de caseína | 20 |
| Dextrosa | 20 |
| Agar | 25 |

4.3.2 Medio de fermentación

Para la producción de celulasas se utilizó el medio propuesto por Mandels y Weber (1969) (Tabla 4.2) sin suplementar, utilizando como fuente de hidrato de carbono los diferentes materiales lignocelulósicos pretratados. La fermentación sumergida para los objetivos se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio, siendo esterilizados en autoclave a $T=121^{\circ}\text{C}$ y $P=1.1$ atm durante 15 minutos.

TABLA 4.2 Medio de Mandels y Weber (1969) para la producción de celulasas.

| Componente | Concentración (g/L) |
|--|---------------------|
| KH ₂ PO ₄ | 2.0 |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 0.3 |
| Urea | 0.3 |
| CaCl ₂ | 0.3 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1.4 |
| FeSO ₄ 7H ₂ O | 0.005 |
| MnSO ₄ H ₂ O | 0.0016 |
| ZnSO ₄ 7H ₂ O | 0.0014 |
| CoCl ₂ | 0.002 |
| Peptona | 1 |
| Hidrato de carbono (material lignocelulósico pretratado) | 10 |

Las condiciones a las que se llevaron a cabo las fermentaciones fueron a 30°C, pH 5 y una agitación de 250 rpm (Infanzón, 2019), con un inóculo de 6×10^6 esp/mL durante 120 horas en una incubadora con agitación Marca Lab Tech, Modelo LSI3016A. Se siguió una cinética tomando tiempos cada 24 h. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado.

4.4 Obtención del extracto enzimático

Después de la fermentación, el extracto enzimático crudo fue filtrado con una bomba al vacío utilizando papel filtro Whatman No. 2. El sobrenadante fue centrifugado (Figura 4.6) a 6,000 rpm por 30 minutos a 4°C y posteriormente se realizó una microfiltración utilizando una membrana Millipore de 0.22 μm .



FIGURA 4.6 Centrífuga 5804 R Marca eppendorf.

Al finalizar la microfiltración el extracto enzimático se almacenó en tubos de 50 mL a 4°C para su posterior evaluación. La actividad enzimática se midió máximo tres días después de haber obtenido el extracto enzimático para evitar su degradación y fue almacenado máximo por 4 semanas.

4.5 Métodos para la medición de actividad enzimática celulasa

Se realizaron pruebas cualitativas y cuantitativas para medir la actividad celulasa de todas las muestras de los extractos enzimáticos obtenidos. El método cualitativo se realizó mediante halos de actividad celulasa revelados con el colorante rojo Congo al 0.1% (p/v) (Theather y Wood, 1982).

Los métodos cuantitativos realizados para obtener la actividad enzimática son:

1. **Actividad celulasa total (FPasa)**, la cual fue determinada por el método de papel filtro establecido por la IUPAC de acuerdo con el procedimiento modificado a partir de Ghose (1987)
2. **Actividad endo- β -1,4-gluconasa (CMCasa)** utilizando carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato de acuerdo con el procedimiento modificado a partir Mandels y Weber (1969) obteniendo la cantidad de azúcares reductores por el método de Miller (1959) utilizando 3,5-dinitrosalicilato (DNS) para ambos casos.

3. **Actividad β -glucosidasa (BGL)** es medida usando como sustrato p-Nitrofenil- β -glucopiranosido (β -pNPG) (Singhania *et al.*, 2011).

A continuación, se detallan cada uno de los métodos realizados.

4.5.1 Método cualitativo por halo de actividad

Se llevó a cabo una prueba cualitativa para determinar la actividad enzimática celulolítica que tiene una muestra de extracto obtenido. Para ello se preparó una caja Petri (Tabla 4.3) horadada con orificios de 0.8 cm y se colocaron 125 μ L de la muestra incubándose durante 24 horas a 50°C. Transcurrido el tiempo de incubación se revelaron los halos que se hayan formado mediante una tinción, utilizando una solución de rojo Congo al 0.1% (p/v) la cual se dejó actuar por 15 min cubriendo toda la caja y posteriormente retiró el sobrenadante del colorante y se realizó un lavado con una solución de NaCl 2 M por 15 minutos (Theather y Wood, 1982).

Al finalizar el tiempo de lavado se eliminó el exceso de la solución de NaCl y se miden los halos claros formados debido a la hidrólisis de la CMC lo que determina la presencia de actividad celulolítica.

TABLA 4.3 Medio para la actividad celulasa cualitativa.

| Componentes | Concentración (g/L) |
|-------------------------|---------------------|
| CMC | 10 |
| CaCl₂ | 0.5 |
| Agar | 15 |

4.5.2 Método de actividad celulasa total (FPasa)

Para la FPasa se utilizó como sustrato tiras de papel filtro Whatman No. 1, con medidas de 1.0 x 6.0 cm (~50 mg). Se agregó 1 mL de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 0.05 M con pH 5.0 y 1 mL de enzima, incubando a 50°C por 60 minutos. Se tomaron 100 μL de muestra cada cinco minutos y se les adicione 100 μL de DNS, para revelar los azúcares reductores producidos se colocaron en un baño de agua en ebullición por 5 min y después se transfirió a un baño de agua fría. Finalmente se adicione 1 mL de agua destilada a cada muestra y se midió a 540 nm en un espectrofotómetro (Figura 4.7).

La FPasa se obtuvo con la siguiente ecuación (4.4):

$$FPU = \left(\frac{m_1}{m_2}\right) * (FD) * \left(\frac{1 \mu\text{mol}}{180.16 \mu\text{g}}\right) * \left(\frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{mg}}\right) = FPU/\text{mL} \quad (4.4)$$

Donde:

m_1 = Pendiente de la absorbencia contra tiempo de la muestra

m_2 = Pendiente de la línea estándar de glucosa

FD= Factor de dilución

Una unidad de actividad celulasa total se define como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μmol de glucosa por minuto bajo condiciones estándares evaluadas.



FIGURA 4.7 Espectrofotómetro Thermo Spectronic Genesys 4001/4.

4.5.3 Método de actividad Endo- β -1,4-glucanasa (CMCasa)

La CMCasa se utilizó como sustrato una solución de celulosa de CMC al 1% en $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 0.05 M con pH 5.0. Primero se agregó 1 mL de CMC al 1% y 1 mL de enzima, incubando a 50°C por 60 minutos. Se tomaron 100 μL de muestra cada 5 min y se le adicióno 100 μL de DNS, para revelar los azúcares reductores producidos se colocaron en un baño de agua en ebullición por 5 min y después se transfirió a un baño de agua fría. Finalmente se adicióno 1 mL de agua destilada a cada muestra y se midió a 540 nm en un espectrofotómetro.

Al obtener las lecturas de absorbencias de las muestras se realizaron los siguientes cálculos para obtener la actividad CMCasa (4.5):

$$U = \left(\frac{m_1}{m_2}\right) * (FD) * \left(\frac{1 \mu\text{mol}}{180.16 \mu\text{g}}\right) * \left(\frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{mg}}\right) = U/\text{mL} \quad (4.5)$$

Donde:

m_1 = Pendiente de la absorbencia contra tiempo de la muestra

m_2 = Pendiente de la línea estándar de glucosa

FD= Factor de dilución

Una unidad de actividad endo- β -1,4-glucanasa se define como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μmol de glucosa por minuto bajo condiciones estándares evaluadas.

4.5.4 Método de actividad β -glucosidasa (BGL)

La BGL se determinó usando como sustrato una solución de *p*-Nitrofenil- β -glucopiranosido (β -*p*NPG) 10 mM en $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 0.05 M pH con 5.0. La reacción se llevó a cabo colocando 1 mL del sustrato y 1 mL del extracto enzimático por 30 minutos, tomando 350 μL de muestra cada 2 o 3 min y se le adicióno 700 μL de Na_2CO_3 0.2 M. El color formado de las muestras se midió a 400 nm en un espectrofotómetro.

Se realizaron los siguientes cálculos para obtener la actividad BGL (U/mL).

$$U = \left(\frac{m_1}{m_2}\right) * (FD) * \left(\frac{1 \mu\text{mol}}{139.11 \mu\text{g}}\right) * \left(\frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{mg}}\right) = U/\text{mL} \quad (4.6)$$

Donde:

m_1 = Pendiente de la absorbencia contra tiempo de la muestra

m_2 = Pendiente de la línea estándar de *p*NP

FD= Factor de dilución

Una unidad de actividad β -glucosidasa se define como los μM de *p*NP liberados por mililitro de enzima por minuto bajo condiciones estándares evaluadas.

4.6 Evaluación del tipo de inóculo del microorganismo

Para evaluar el efecto del tipo de inóculo se realizaron 2 pruebas: con adaptación y sin adaptación. La adaptación del microorganismo se llevó a cabo en un matraz de 50 mL con un volumen de 10 mL de medio que se muestra en la Tabla 4.4, utilizando como hidrato de carbono el material lignocelulósico que brindó mayor actividad celulolítica, a 30°C, pH 5.0 y un inóculo de 6×10^6 esp/mL, por 24 horas previas a la fermentación.

Sin adaptación se realizó la inoculación directa al medio de fermentación de 6×10^6 esp/mL de la solución de esporas obtenida.

TABLA 4.4 Medio de adaptación de *A. niger* ITV-02.

| Componentes | Concentración (g/L) |
|----------------------|---------------------|
| Extracto de levadura | 10 |
| Peptona de caseína | 20 |
| Dextrosa | 10 |
| Hidrato de carbono | 10 |

Los experimentos se realizaron por duplicado siendo las variables de respuesta la actividad FPasa, la CMCasa y la BGL. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el software STATGRAPHICS® por Prueba de Tukey para determinar diferencias significativas.

4.7 Evaluación de la concentración de fuente de carbono

La fermentación sumergida se llevó a cabo con la metodología presentada en el punto 4.3.2, utilizando como hidrato de carbono el material lignocelulósico con

mayor actividad celulolítica y determinado el efecto del tipo de inóculo del microorganismo. Se evaluaron tres concentraciones de sustrato: 10, 20 y 30 g/L. Los experimentos se realizaron por duplicado siendo las variables de respuesta la FPasa, la CMCasa y la BGL. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el software STATGRAPHICS® por Prueba de Tukey para determinar diferencias significativas.

4.8 Optimización de la producción de celulasas

Se planteó un diseño experimental Box-Behnken (Tabla 4.5) considerándose como variables independientes a tres niveles: temperatura (30, 34 y 38°C), pH (4.5, 5.5 y 6.5) y agitación (150, 200 y 250 rpm).

TABLA 4.5. Rango experimental y niveles de la producción de celulasas.

| FACTOR | NIVELES | | |
|------------------|----------------|----------|-----------|
| | -1 | 0 | +1 |
| Temperatura (°C) | 30 | 34 | 38 |
| pH | 4.5 | 5.5 | 6.5 |
| Agitación (rpm) | 150 | 200 | 250 |

La Tabla 4.6 muestra el diseño propuesto con valores codificados y reales teniéndose como variable de respuesta la FPasa. Posteriormente se realizó un análisis estadístico utilizando el software STATGRAPHICS® para determinar las condiciones óptimas para la producción de celulasas a partir del diseño de experimentos planteado.

Tabla 4.6. Diseño Box-Behnken con valores codificados y reales.

| PRUEBA | VARIABLES CODIFICADAS | | | VARIABLES NATURALES | | |
|-----------|-----------------------|----|-----------|---------------------|-----|-----------|
| | Temperatura | pH | Agitación | Temperatura | pH | Agitación |
| | °C | | rpm | °C | | rpm |
| 1 | -1 | -1 | 0 | 30 | 4.5 | 200 |
| 2 | 1 | -1 | 0 | 38 | 4.5 | 200 |
| 3 | -1 | 1 | 0 | 30 | 6.5 | 200 |
| 4 | 1 | 1 | 0 | 38 | 6.5 | 200 |
| 5 | -1 | 0 | -1 | 30 | 5.5 | 150 |
| 6 | 1 | 0 | -1 | 38 | 5.5 | 150 |
| 7 | -1 | 0 | 1 | 30 | 5.5 | 250 |
| 8 | 1 | 0 | 1 | 38 | 5.5 | 250 |
| 9 | 0 | -1 | -1 | 34 | 4.5 | 150 |
| 10 | 0 | 1 | -1 | 34 | 6.5 | 150 |
| 11 | 0 | -1 | 1 | 34 | 4.5 | 250 |
| 12 | 0 | 1 | 1 | 34 | 6.5 | 250 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 34 | 5.5 | 200 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 34 | 5.5 | 200 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 34 | 5.5 | 200 |

La producción de celulasas se llevó acabo tomando en cuenta los resultados obtenidos en los objetivos anteriores: el material lignocelulósico seleccionado, el efecto del tipo de inoculación y la concentración optima de sustrato. Todos los gráficos de superficie de respuesta se realizaron en el Software SigmaPlot®.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Evaluación de diferentes materiales lignocelulósicos como sustrato

Los materiales lignocelulósicos: BC, BS, RM, CA y PC fueron previamente pretratados mecánicamente para disminuir su tamaño de partícula y por una hidrólisis alcalina con las condiciones establecidas por Morán (2018) para su posterior evaluación.

5.1.1 Caracterización de los materiales lignocelulósicos crudos y pretratados

Los resultados obtenidos de la caracterización de los cinco materiales crudos y pretratados se muestran en la Tabla 5.1, donde se observa que el pretratamiento alcalino removió parte de la lignina en todos los materiales. En el RM se alcanzó un 83% de remoción, disminuyendo de 23.5% de lignina a 3.4%, contrario a los otros residuos como el BS, la PC, el BC y la CA, en los cuales únicamente se removió el 65%, 44%, 42% y 42% de lignina respectivamente. Este resultado impacta en el porcentaje de celulosa final, donde el RM es el que presenta un mayor contenido con 64% seguido por el BS y el BC ambos con 59.3%, la PC 57.7% y por último la CA con 49.8%.

TABLA 5.1 Composición lignocelulósica de los materiales crudos y pretratados.

| Material lignocelulósico | Celulosa (%) | | Hemicelulosa (%) | | Lignina (%) | | Remoción de lignina (%) |
|-----------------------------|--------------|------------|------------------|------------|-------------|------------|-------------------------------|
| | Crudo | Pretratado | Crudo | Pretratado | Crudo | Pretratado | |
| RM | 35.7 ± 0.9 | 64.6 ± 0.2 | 19.7 ± 0.9 | 20.3 ± 0.6 | 25.6 ± 0.5 | 4.4 ± 1.0 | 83 |
| BS | 28.9 ± 1.1 | 59.3 ± 1.9 | 15.7 ± 0.9 | 24.6 ± 1.5 | 32.6 ± 0.6 | 11.3 ± 0.2 | 65 |
| PC | 42.0 ± 0.0 | 57.7 ± 0.2 | 28.0 ± 0.0 | 18.5 ± 0.6 | 20.0 ± 0.0 | 11.1 ± 0.4 | 44 |
| BC | 37.2 ± 2.7 | 59.3 ± 1.0 | 15.0 ± 0.8 | 24.7 ± 0.1 | 25.0 ± 0.3 | 14.5 ± 0.3 | 42 |
| CA | 27.3 ± 0.3 | 49.8 ± 2.3 | 15.3 ± 0.4 | 15.2 ± 0.0 | 29.6 ± 0.8 | 17.2 ± 1.3 | 42 |

Posterior al pretratamiento alcalino se observaron cambios en la forma, color y textura de los materiales lignocelulósicos (Figura 5.1), obteniendo materiales con mayor índice de cristalinidad, tal como lo reporta Partida-Sedas (2017) con bagazo de sorgo, lo cual ayuda a aumentar la accesibilidad del microorganismo al complejo lignocelulósico debido a que la hidrólisis alcalina además de remover la lignina genera cambios en la estructura del material lignocelulósico haciéndolo más poroso (Adsul, *et al.*, 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

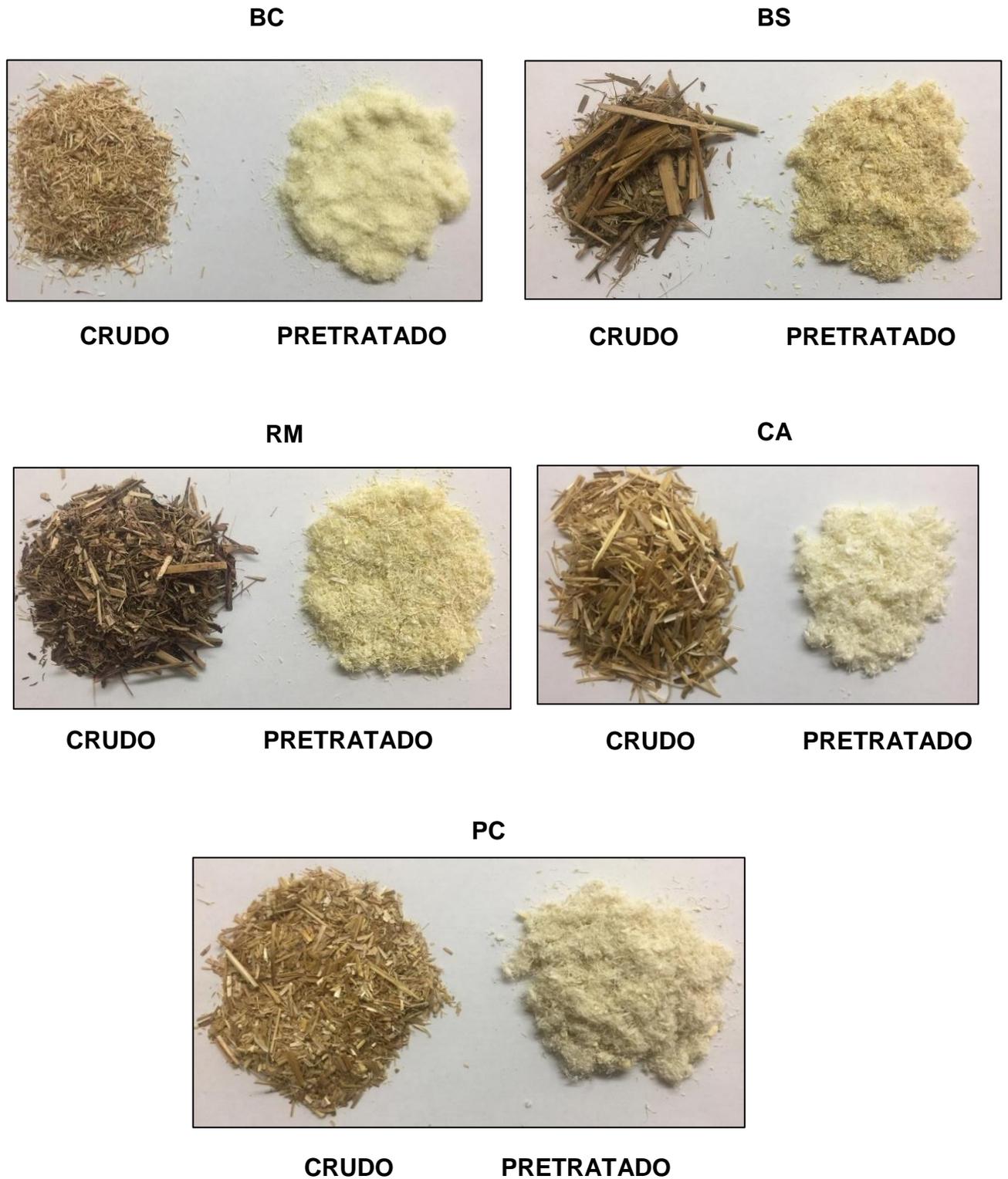


FIGURA 5.1 Estructura física de los materiales lignocelulósicos crudos y pretratados.

5.1.2 Producción de celulasas con diferentes sustratos

Después de realizar los pretratamientos, mecánico y alcalino, los materiales lignocelulósicos fueron evaluados con la finalidad de determinar cuál sustrato genera mayor producción de celulasas en *A. niger* ITV-02.

El efecto del tipo de material lignocelulósico en la producción de celulasas fue evaluado cualitativamente por halos de actividad y cuantitativamente determinando su actividad FPasa, la CMCasa y la BGL, para ello se cuantificó la actividad de los extractos obtenidos desde el tiempo 0 hasta las 120 h, tomando muestra cada 24 h.

De forma cualitativa se observa en la Figura 5.2 que los halos de actividad siguen el mismo perfil en el BC, el BS, el RM y la PC y al realizar un análisis estadístico mediante la Prueba de Tukey ($P > 0.95$) utilizando el software STATGRAPHICS® (Centurión XVI Versión 16.1.18), el cual es un programa estadístico que proporciona un análisis de varianza para determinar si hay diferencias significativas entre las muestras, mostró que entre estos 4 materiales no hay diferencia significativa (Figura 5.3), mientras que en la CA el halo de mayor tamaño apenas logró 1.4 cm a las 120 h (Tabla 5.2).

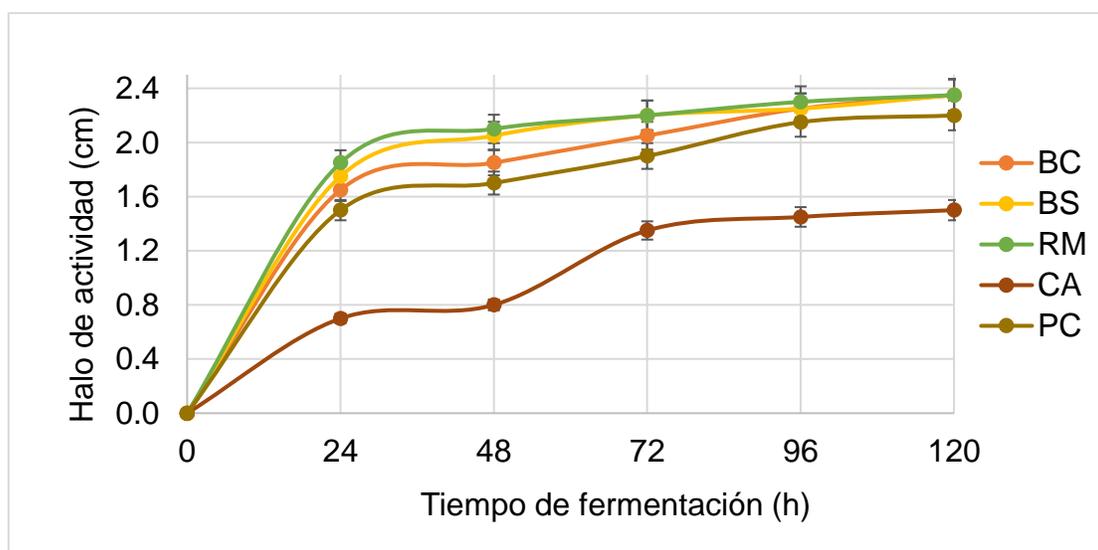


FIGURA 5.2 Halos de actividad producidos por *A. niger* ITV-02 en diferentes materiales lignocelulósicos.

TABLA 5.2 Prueba cualitativa con extractos de 120 h.

| Material lignocelulósico | Halo (cm) |
|--------------------------|------------------|
| BC | 2.3 ^a |
| BS | 2.4 ^a |
| RM | 2.4 ^a |
| CA | 1.4 ^b |
| PC | 2.2 ^a |

Tukey ($P>0.95$) Letras diferentes muestran diferencia significativa.

Debido a que el mayor halo de actividad se obtuvo a las 120 h en todos los casos, las evaluaciones cuantitativas se realizaron a ese tiempo.

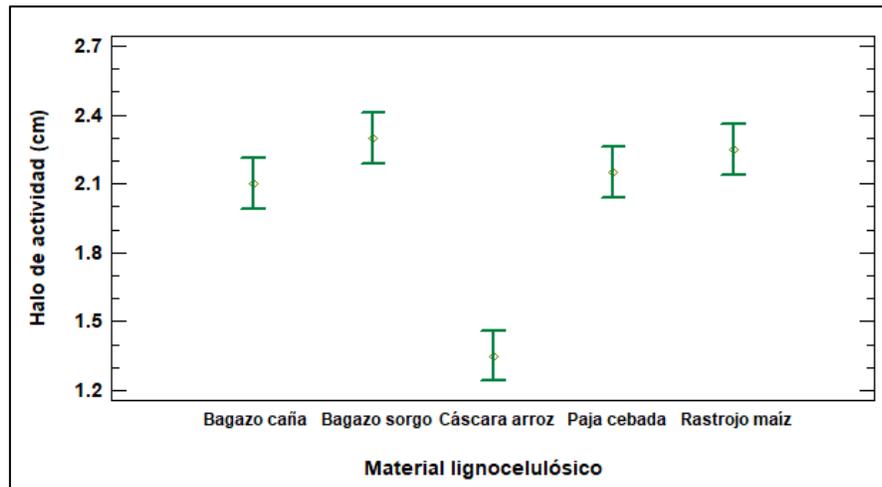


FIGURA 5.3 Análisis estadístico de la prueba cualitativa de la evaluación de sustrato.

Los resultados de las pruebas cuantitativas se muestran en la Tabla 5.3, donde se observó que en la CMCasa no hubo diferencia significativa entre los cinco sustratos analizados, mientras que en la FPasa se observa que en el BS es de 0.134 FPU/mL y en el RM 0.127 FPU/mL, mostrando diferencia significativa contra los otros extractos

obtenidos a partir de BC, PC y CA. Por otro lado, al evaluar la BGL el RM brinda un extracto con una BGL de 4.10 U/mL, significativamente mayor que todos los otros materiales (Figura 5.4), lo cual es de gran importancia ya que la BGL es la enzima que completa el paso final de la hidrólisis de la celulosa. Trabajos como los de Singhania, *et al.*, (2013) enfatizan la necesidad de concentraciones elevadas de esta enzima debido a que hidroliza la celobiosa en unidades de glucosa, y si un extracto enzimático carece de BGL la celobiosa se acumula provocando una inhibición por producto a las endo-glucanasas y exo-glucanasas, disminuyendo la capacidad de hidrólisis de las enzimas.

TABLA 5.3 Prueba cuantitativa con extractos de 120 h.

| Material lignocelulósico | CMCasa (U/mL) | FPasa (FPU/mL) | βGL (U/mL) |
|---------------------------------|----------------------|-----------------------|-------------------|
| BC | 0.013 ^a | 0.095 ^b | 2.19 ^c |
| BS | 0.016 ^a | 0.134 ^a | 3.81 ^b |
| RM | 0.018 ^a | 0.127 ^a | 4.10 ^a |
| CA | 0.015 ^a | 0.025 ^c | 0.18 ^d |
| PC | 0.015 ^a | 0.094 ^b | 2.51 ^c |

Tukey (P>0.95) Letras diferentes muestran diferencia significativa.

La actividad celulolítica es difícil de comparar entre las diversas investigaciones debido a que los factores involucrados en su producción son variados. Sin embargo, los resultados de este trabajo se asemejan a los de Juhasz, *et al.*, (2005), quienes evaluaron cuatro diferentes sustratos: Solka Flock, RM, residuos de coníferas y residuos de sauces, siendo el RM el material lignocelulósico que brinda un extracto con mayor actividad FPasa (1.2 FPU/mL), lo que podría deberse a que después del pretratamiento que realizaron (explosión con vapor de SO₂) el RM fue el material lignocelulósico que tenía mayor contenido de celulosa inicial, situación similar a la de este trabajo.

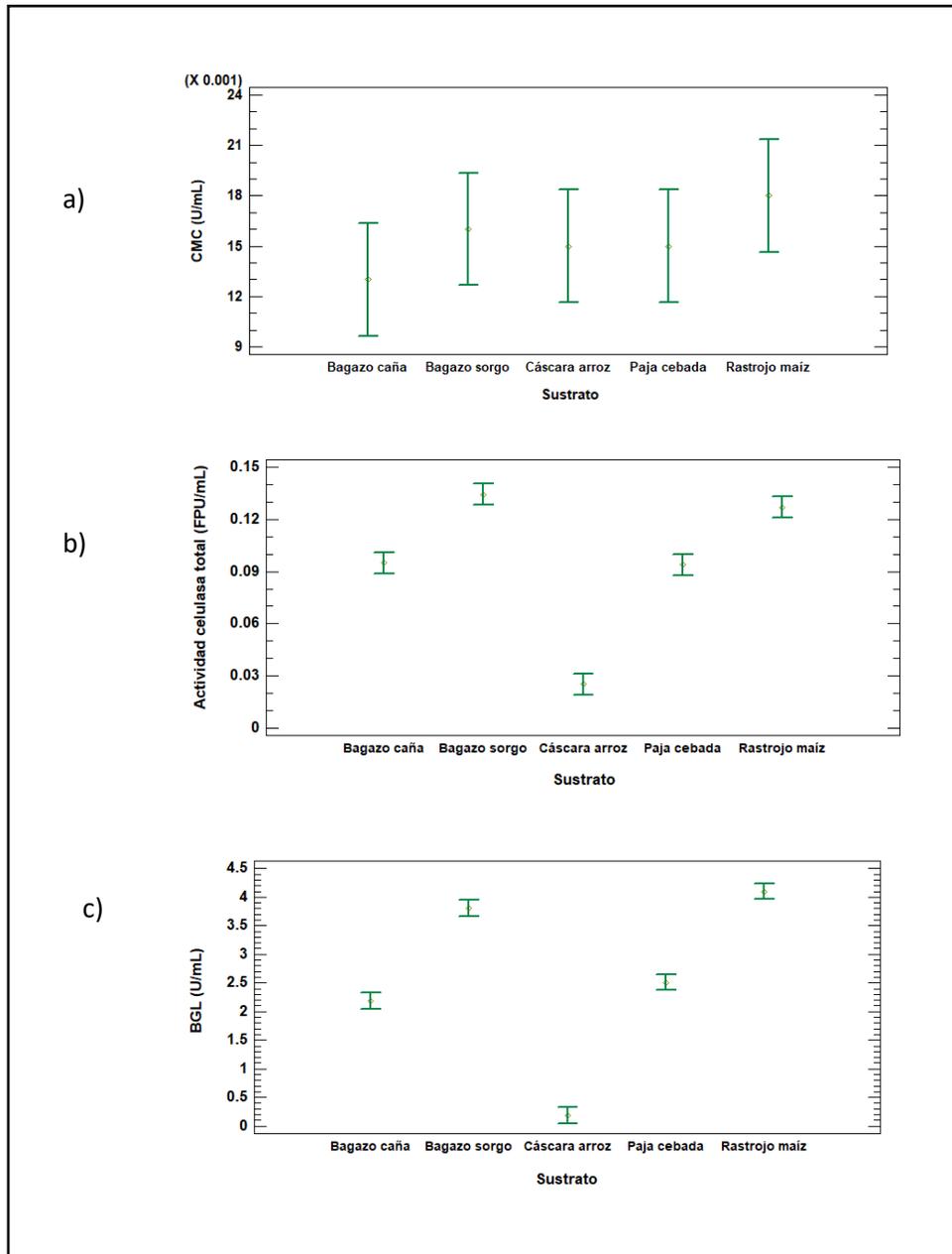


FIGURA 5.4 Gráficos de pruebas de diferencia significativa de las actividades enzimáticas con diferentes sustratos: a) CMCasa, b) FPasa y c) BGL con diferentes sustratos.

Hay trabajos como los de Patel *et al.*, (2017) donde evaluaron tres diferentes microorganismos (*Trichoderma*, *Aspergillus* y *Penicillium*) y 3 sustratos (aserrín, olote de maíz y salvado de trigo), siendo el hongo *Aspergillus* el que brinda un extracto con mayor actividad CMCasa (1.42 U/mL) utilizando olote de maíz como sustrato. También el de Gao *et al.*, (2008) donde utilizaron la cepa *A. terreus* M11 sobre seis sustratos diferentes, obteniendo la mayor actividad celulasa utilizando RM como sustrato. Se observa el gran potencial que tiene *Aspergillus* para producir estas enzimas y además los residuos del maíz (rastrajo y olote) muestran ventaja como sustrato contra otros materiales lignocelulósicos, por ejemplo, Ghori, *et al.*, (2011) establecen la producción de celulasas de *A. niger* NRRL 567 a partir de rastrajo de maíz obteniendo un extracto con actividad CMCasa de 1.15 U/mL.

Posterior a la fermentación se realizó la caracterización del material lignocelulósico residual (Tabla 5.4) para determinar el consumo de celulosa durante el proceso. Se observó que en aquellos sustratos donde se registró la mayor actividad BGL (RM y BS) el contenido de celulosa es menor, RM 12.2% y BS 16.0% (Figura 5.5, Tablas 5.3 y 5.4). Es decir, es posible que la BGL tenga un efecto directo en la degradación de la celulosa del material lignocelulósico. Además, durante el seguimiento que se le dio al consumo de los sustratos, la hemicelulosa se agota al 100% durante las primeras 24 horas. La disponibilidad de la hemicelulosa en el residuo lignocelulósico puede deberse a que durante el pretratamiento alcalino también se hidroliza parcialmente este polímero, lo que permite que sea más accesible y su hidrólisis se lleve a cabo con mayor rapidez.

TABLA 5.4 Caracterización de los materiales residuales.

| Componente (%) | BC | BS | RM | CA | PC |
|---------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Celulosa | 28.2 ± 0.0 | 16.0 ± 0.0 | 12.2 ± 0.0 | 18.2 ± 0.0 | 18.9 ± 0.0 |
| Hemicelulosa | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 |
| Lignina | 18.8 ± 0.0 | 14.5 ± 0.0 | 9.8 ± 0.0 | 27.4 ± 0.0 | 17.6 ± 0.0 |

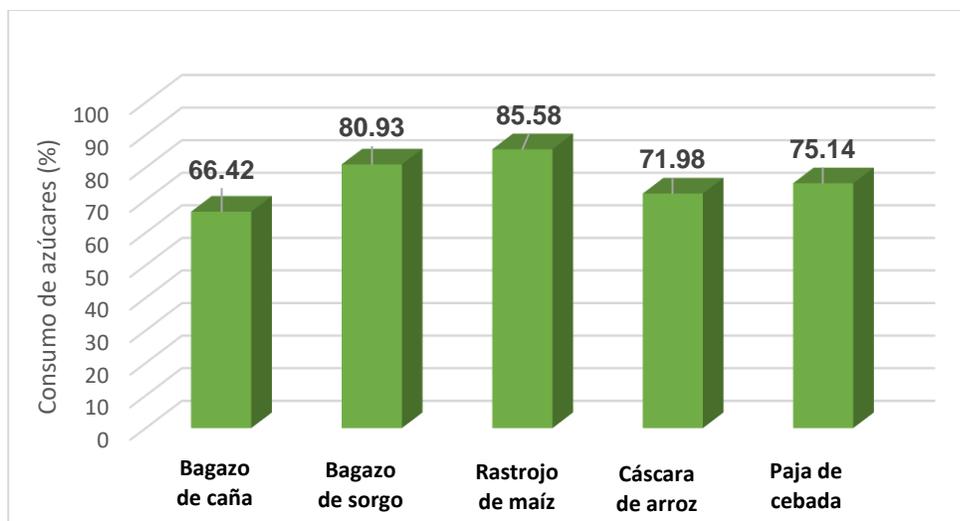


FIGURA 5.5 Consumo de azúcares en los diferentes sustratos.

Al evaluar en conjunto los resultados obtenidos del pretratamiento alcalino y el efecto del tipo de sustrato sobre las actividades enzimáticas, se determinó que el RM es el material lignocelulósico en el cual el hongo produce un extracto enzimático con mayor actividad celulolítica y por lo que este residuo se eligió para trabajar en los próximos objetivos.

5.2 Efecto de del tipo de inoculación sobre la producción de celulasas

Se evaluó el efecto del tipo de inoculación del microorganismo con una adaptación de 24 horas previas a la fermentación y sin adaptación, inoculando las esporas directamente, utilizando como sustrato RM sobre la producción de celulasas. Se tomaron muestras cada 12 h para observar el comportamiento de producción de celulasas.

5.2.1 Prueba cualitativa del tipo de inóculo (con y sin adaptación).

Los resultados obtenidos mostraron (Figura 5.6) que el proceso realizado con adaptación la producción de celulasas es menor que sin adaptación, además se observó que la producción de celulasas se ve incrementada de forma lineal desde las 36 h a las 108 h de fermentación con adaptación, mientras que sin adaptación la producción de celulasas se torna exponencial desde el inicio de la fermentación.

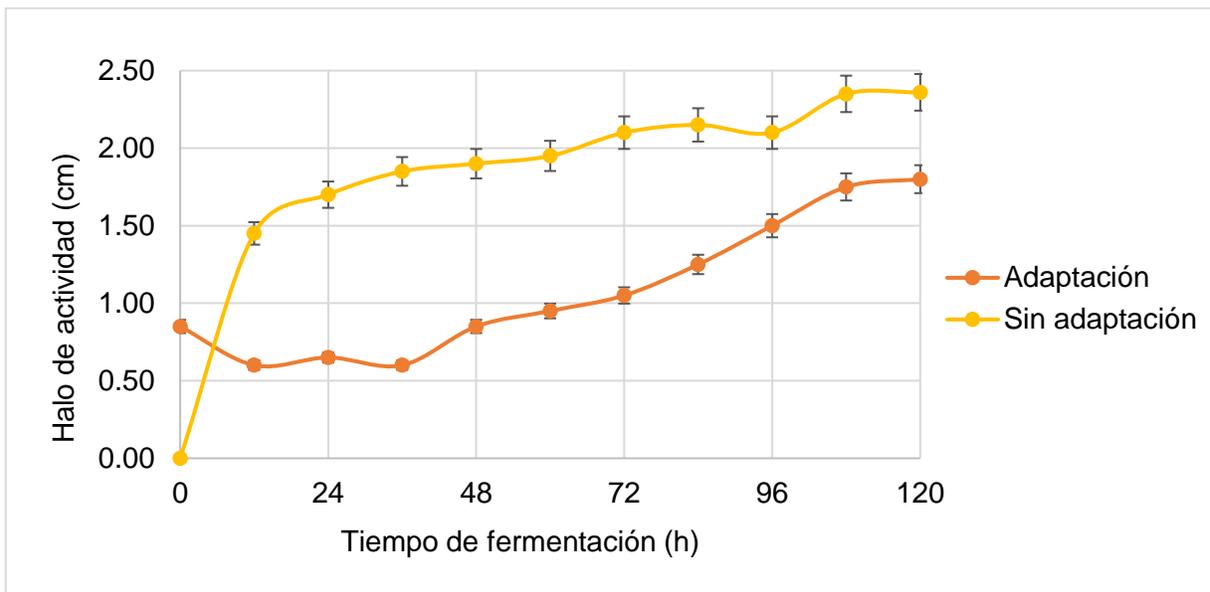


FIGURA 5.6 Efecto del tipo de inóculo en la producción de celulasas (prueba cualitativa).

En ambos casos se obtiene el mayor halo de actividad a las 120 h de fermentación, aunque sin adaptación el halo fue de 1.28 veces mayor que con adaptación, 2.31 cm para el efecto sin adaptación y 1.80 cm con adaptación. Al realizar la Prueba de Tukey los resultados muestran una diferencia significativa entre ellos (Figura 5.7).

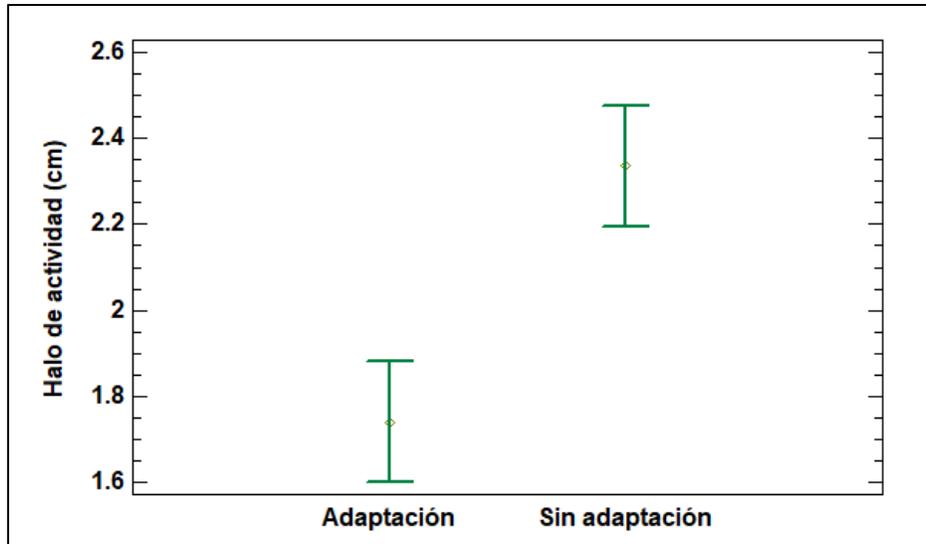


FIGURA 5.7 Análisis estadístico de la prueba cualitativa del efecto del tipo de inóculo.

Debido a que en ambos casos el extracto con un halo mayor fue a las 120 h de fermentación, se realizaron las pruebas cuantitativas a estos extractos.

5.2.2 Prueba cuantitativa del tipo de inóculo (con y sin adaptación).

Los extractos enzimáticos obtenidos a las 120 h se evaluaron determinando su FPasa, CMCasa y BGL, los resultados se muestran en la Tabla 5.5.

TABLA 5.5 Prueba cuantitativa del efecto del tipo de inóculo.

| Actividad enzimática | Adaptación | Sin Adaptación |
|----------------------|--------------------|--------------------|
| CMCasa (U/mL) | 0.017 ^a | 0.020 ^a |
| FPasa (FPU/mL) | 0.121 ^b | 0.132 ^a |
| β GL (U/mL) | 3.890 ^b | 4.060 ^a |

Tukey ($P > 0.95$) Letras diferentes muestran diferencia significativa.

Se observa que la actividad CMCasa es similar en ambos casos, mientras que la actividad FPasa y BGL es mayor en el proceso sin adaptación obteniendo 0.132 FPU/mL y 4.06 U/mL respectivamente.

En diversos trabajos se ha reportado que la producción de celulasas es mayor cuando se parte de conidios en comparación con hifas, micelio y protoplastos, es decir, la morfología del hongo es un factor importante en la producción de celulasas (Kubicek, 1987; Ahamed y Vermette, 2009; Singhania, *et al.*, 2010 y Metz, *et al.*, 2011). Lo anterior puede deberse a que las celulasas producidas por el microorganismo utilizan vesículas como transporte, las cuales atraviesan la membrana plasmática celular para liberar estas proteínas al espacio periplásmico. Sin embargo, si la pared celular es madura la enzima podría retenerse en la pared y no ser liberado (Kubicek, 1987; Ahamed y Vermette, 2009), es posible que se observe este fenómeno en los procesos de adaptación.

Posterior a la fermentación se realizó la caracterización del RM residual (Tabla 5.6) para determinar el porcentaje de hidrólisis y consumo de celulosa en cada proceso.

TABLA 5.6 Caracterización del RM residual.

| Tipo de inóculo | Celulosa (%) | Hemicelulosa (%) | Lignina (%) | Consumo de azúcares (%) |
|------------------------|---------------------|-------------------------|--------------------|--------------------------------|
| Adaptación | 36.5 ± 0.8 | 12.5 ± 1.0 | 8.5 ± 0.9 | 42.2 |
| Sin Adaptación | 13.0 ± 0.6 | 0.0 ± 0.0 | 11.0 ± 0.7 | 84.6 |

Se observó que al realizar la fermentación sin adaptación se hidroliza un mayor porcentaje de azúcares totales (84%), caso contrario al proceso con adaptación donde solo se consumió el 42%. Durante el seguimiento de los experimentos se monitoreo el consumo durante la fermentación, donde se observó que en el proceso sin adaptación la hemicelulosa es consumida por completo las primeras veinticuatro horas (Figura 5.8-b) mientras que en el proceso con adaptación la hemicelulosa no es consumida en

su totalidad. Esto puede deberse a lo reportado por Gutiérrez-Rojas, Moreno-Sarmiento y Montoya en 2014, donde la transcripción de los genes involucrados en la síntesis de enzimas se ve aumentada en los conidios y por ende se incrementa la hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa.

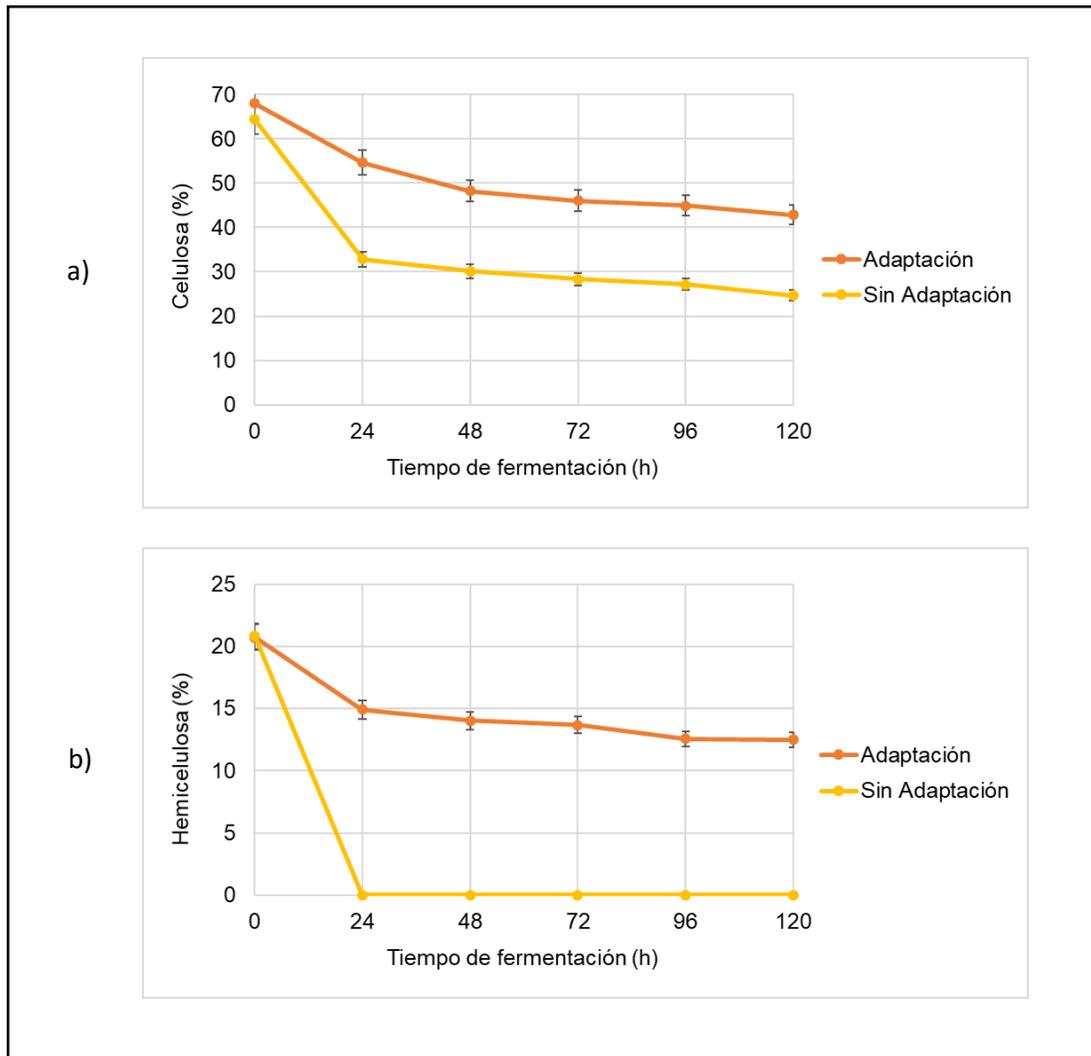


FIGURA 5.8 Consumo de a) Celulosa y b) Hemicelulosa con y sin adaptación de *A. niger* ITV-02.

De acuerdo con lo obtenido, se concluyó que el proceso sin adaptación, es decir inoculando directamente las esporas, brinda un extracto enzimático con mayor actividad celulolítica.

5.3 Evaluación de la concentración de sustrato

Para evaluar el efecto de la concentración del sustrato se utilizaron 3 concentraciones de sustrato inicial: 10, 20 y 30 g/L sobre la producción de células, en una FS por 120 h tomando muestras cada 24 h.

5.3.1 Prueba cualitativa de extractos a diferentes concentraciones

Los resultados obtenidos muestran (Figura 5.9) que utilizando 10 y 20 g/L de RM hay un comportamiento similar a lo largo de la fermentación, sin embargo, con 30 g/L de sustrato inicial, la producción de enzimas inicia después de 24 h y a las 96 h comienza a disminuir.

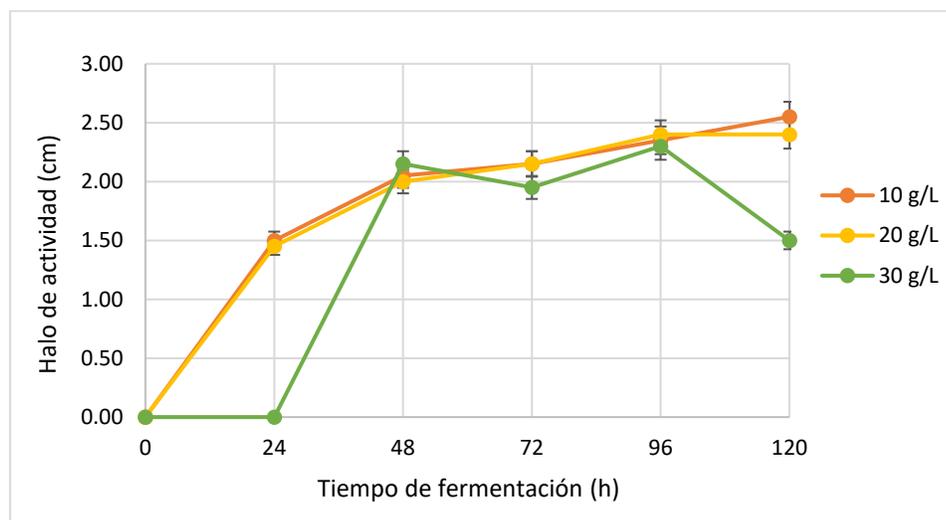


FIGURA 5.9 Efecto de la concentración de RM en la producción de celulasas.

Se observó que con una concentración inicial de 10 g/L se obtiene el mayor halo de actividad (2.55 cm) en comparación con 20 g/L al obtener un halo de 2.40 cm a las 120 h. Sin embargo, con 30 g/L se obtiene el mayor halo (2.30 cm) a las 96 h y después la actividad disminuyó.

5.3.2 Prueba cuantitativa de extractos a diferentes concentraciones

Para realizar una comparación cuantitativa se evaluaron los extractos enzimáticos obtenidos a las 96 y 120 h, determinando su actividad FPasa, CMCasa y BGL, los resultados se muestran en la Tabla 5.7. En la Figura 5.10 se observa el análisis estadístico realizado por la Prueba de Tukey para obtener diferencias significativas entre los extractos obtenidos.

TABLA 5.7 Efecto de la concentración de RM en la producción de celulasas.

| Actividad enzimática | 10 g/L | | 20 g/L | | 30 g/L | |
|-----------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| | 96 h | 120 h | 96 h | 120 h | 96 h | 120 h |
| CMCasa (U/mL) | 0.025 ^{ab} | 0.032 ^a | 0.020 ^{bc} | 0.014 ^c | 0.013 ^{cd} | 0.006 ^d |
| FPasa (FPU/mL) | 0.098 ^b | 0.128 ^a | 0.043 ^c | 0.033 ^{cd} | 0.036 ^c | 0.024 ^d |
| βGL (U/mL) | 3.46 ^{ab} | 4.01 ^a | 2.26 ^b | 0.499 ^c | 2.62 ^b | 0.126 ^c |

Tukey (P>0.95) Letras diferentes muestran diferencia significativa.

El extracto enzimático con mayor FPasa, CMCasa y BGL se obtiene con una concentración de sustrato de 10 g/L a las 120 h de fermentación, ya que se observa que a mayores concentraciones de RM la producción de celulasas disminuye. Estos resultados son similares a los obtenidos por Kandari, *et al.* en el 2013 al evaluar la concentración de paja de arroz pretratada desde 5 hasta 30 g/L, obteniendo el extracto con mayor actividad a 15 g/L, los autores reportaron que al incrementar la concentración de sustrato no benefició la producción de enzimas. Así mismo, en el trabajo de Patel, *et al.* (2017) la concentración óptima utilizando olote de maíz como sustrato se obtuvo utilizando 15 g/L con una cepa *Aspergillus* y al aumentar la concentración a 20 g/L la actividad se vio disminuida.

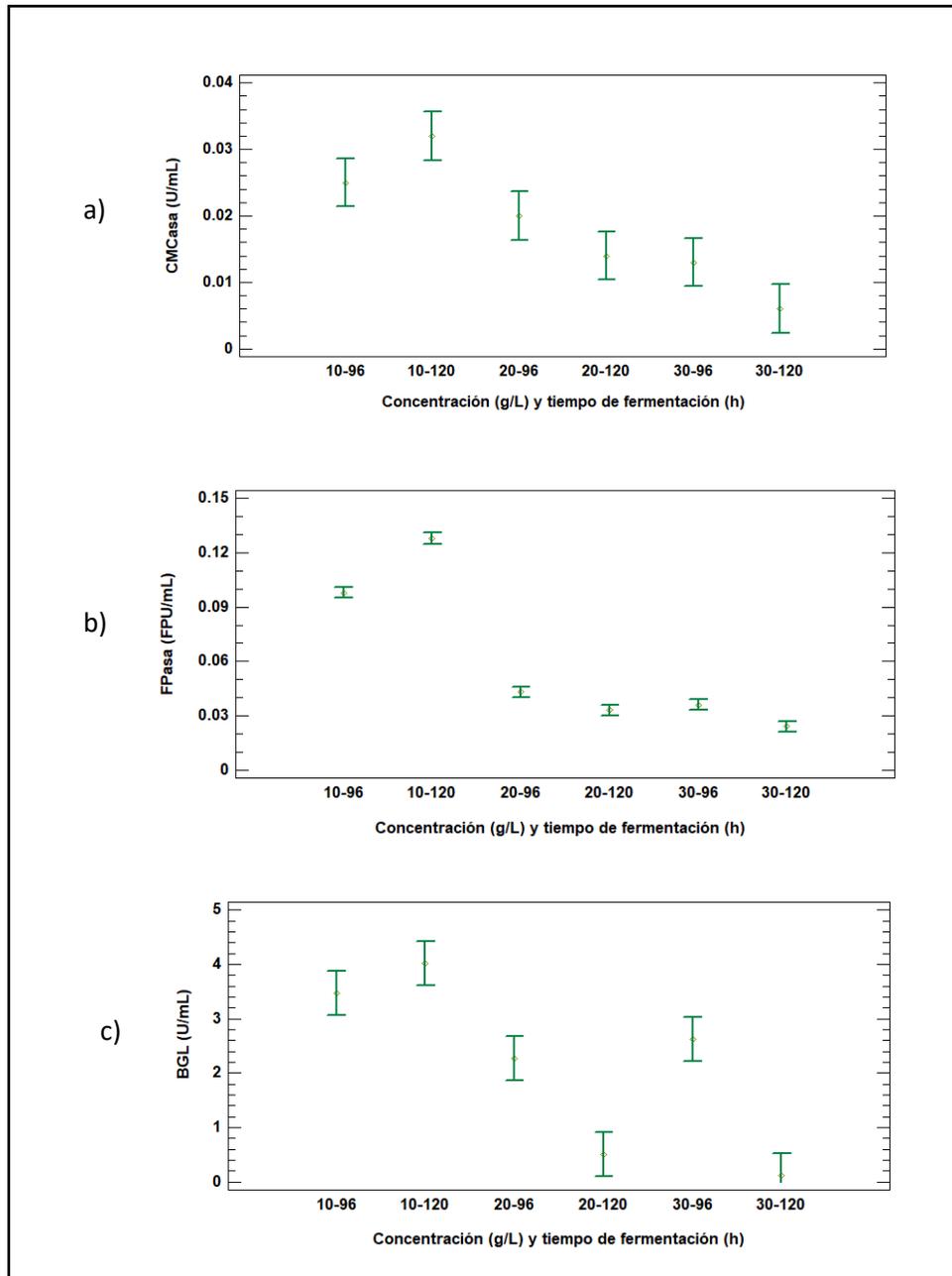


FIGURA 5.10 Gráficos de pruebas de diferencia significativa de las actividades: a) CMCasa, b) FPasa y c) BGL a diferentes concentraciones.

Este efecto podría estar ocurriendo debido a inhibición por sustrato según lo reportado por Keshk (2016), ya que a altas concentraciones de sustrato las enzimas no logran cubrir toda la superficie del sustrato y el sinergismo que debe haber entre las celulasas para llevarse a cabo la hidrólisis se ve limitado al no estar cerca una de otra.

Por lo tanto, la concentración de 10 g/L de RM se define como la concentración óptima de sustrato para la producción de celulasas de *A. niger* ITV-02 en este trabajo.

5.4 Optimización de la producción de celulasas

La optimización se realizó mediante un diseño experimental Box-Behnken siendo las variables la temperatura, pH y agitación al ser las condiciones fisicoquímicas más importantes en sistemas de FS. La variable de respuesta fue la FPasa. Los resultados obtenidos en este objetivo se presentan en la Tabla 5.8, donde se puede observar que la mayor actividad FPasa se obtuvo en los experimentos centrales (34°C, pH 5.5 y 200 rpm) y el experimento donde se obtuvo la menor actividad fue en el 4 (38°C, pH 6.5 y 200 rpm).

TABLA 5.8 Resultados obtenidos de la optimización.

| Experimento | Variables naturales | | | Variable de respuesta |
|-------------|---------------------|-----|-----------|-----------------------|
| | Temperatura | pH | Agitación | FPasa (FPU/mL) |
| 1 | 30 | 4.5 | 200 | 0.172 |
| 2 | 38 | 4.5 | 200 | 0.123 |
| 3 | 30 | 6.5 | 200 | 0.095 |
| 4 | 38 | 6.5 | 200 | 0.093 |
| 5 | 30 | 5.5 | 150 | 0.141 |
| 6 | 38 | 5.5 | 150 | 0.175 |
| 7 | 30 | 5.5 | 250 | 0.185 |
| 8 | 38 | 5.5 | 250 | 0.153 |
| 9 | 34 | 4.5 | 150 | 0.165 |
| 10 | 34 | 6.5 | 150 | 0.135 |
| 11 | 34 | 4.5 | 250 | 0.149 |
| 12 | 34 | 6.5 | 250 | 0.136 |
| 13 | 34 | 5.5 | 200 | 0.254 |
| 14 | 34 | 5.5 | 200 | 0.255 |
| 15 | 34 | 5.5 | 200 | 0.256 |

En la Figura 5.10 se puede observar la interacción entre las 3 variables naturales del modelo, revelando los valores óptimos obtenidos y estableciendo la ecuación de regresión, la cual presenta un ajuste (R^2) del 97.37%.

$$\begin{aligned}
 FPasa = & -6.55756 + 0.247437 * Temperatura + 0.697625 * pH + 0.007635 \\
 & * Agitación - 0.00365625 * Temperatura^2 + 0.0029375 \\
 & * Temperatura * pH - 0.0000825 * Temperatura * Agitación - 0.07575 \\
 & * pH^2 + 0.000085 * pH * Agitación - 0.0000132 * Agitación^2
 \end{aligned}$$

Los valores óptimos obtenidos son: $T=33^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5.3$ y agitación de 200 rpm, que arrojan un valor teórico de actividad FPasa de 0.256 FPU/mL, mismo que se corroboró experimentalmente obteniendo un valor de 0.215 FPU/mL lo que representa una correlación del 84%. Aumentando la actividad 1.6 veces antes de optimizar.

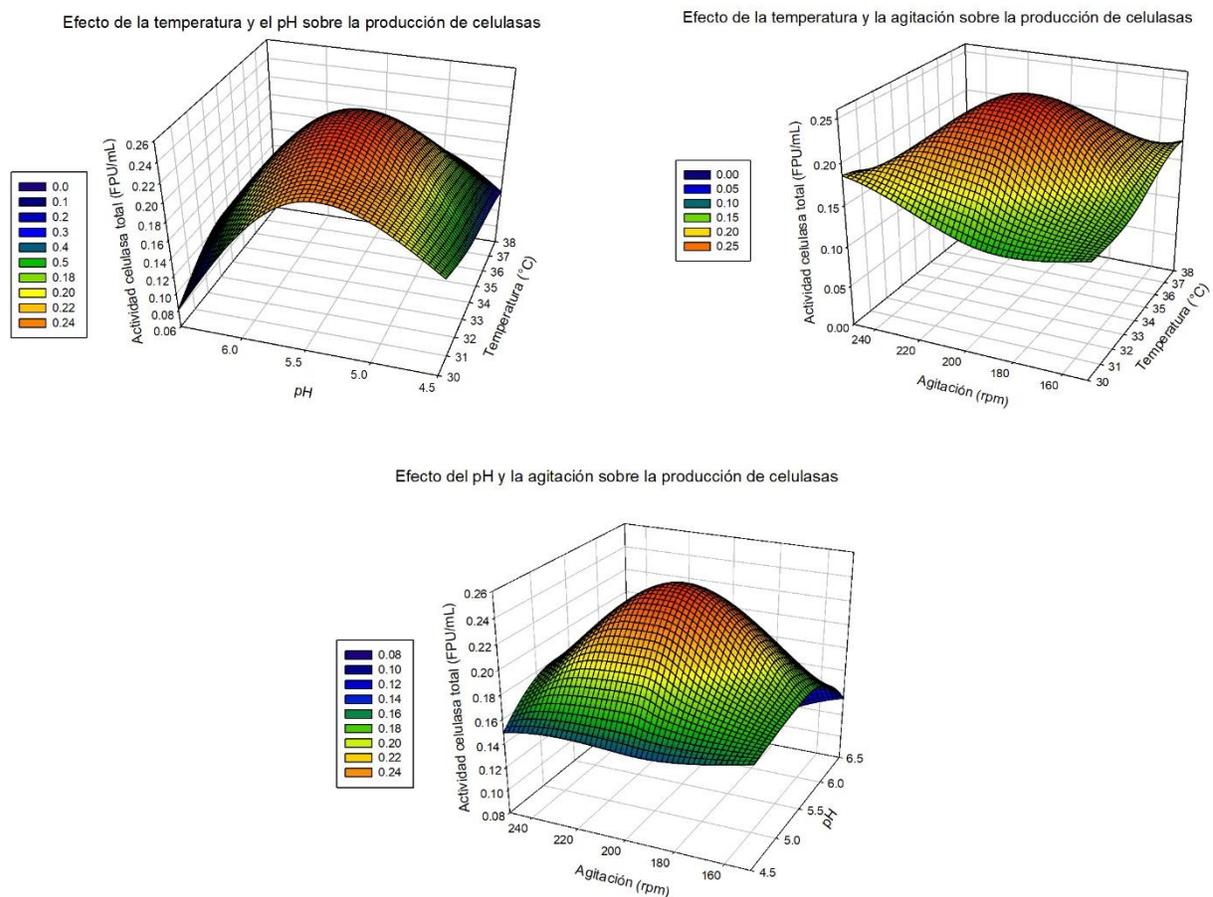


FIGURA 5.10 Superficie de respuesta de la actividad celulosa total.

Del análisis realizado se obtuvo que la variable que tiene un mayor efecto sobre la producción de celulasas es el pH (Figura 5.12) seguido de la temperatura y por último la agitación. Esto puede deberse a lo reportado por Wang, *et al.*, (2005) donde se establece que *A. niger* es un microorganismo que acidifica el medio de acuerdo a su crecimiento y que a pH ácidos este microorganismo tiende a expresar proteasas y fosfatasas las cuales disminuyen la actividad celulolítica del extracto producido.

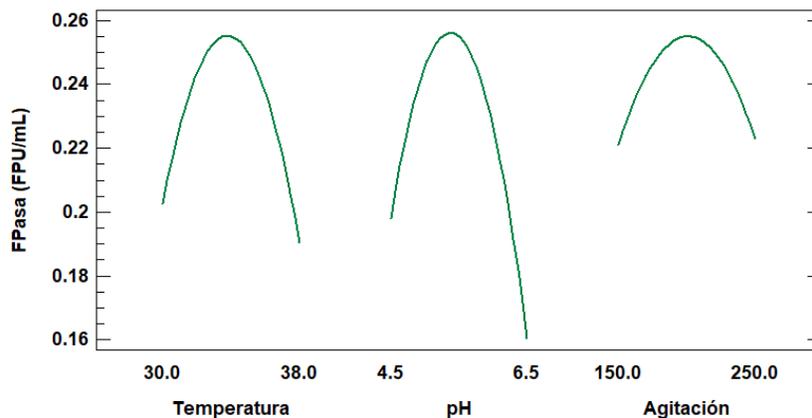


FIGURA 5.12 Efecto de las variables sobre la FPasa.

Las condiciones óptimas son diferentes para cada microorganismo y hay diversos reportes sobre los rangos óptimos para *A. niger* desde un pH 4.0 hasta 7.0 (Pandey, *et al.*, 2017), sin embargo, los resultados obtenidos de Charitha y Kumar (2012) son similares a los de este trabajo, ya que obtuvieron su mayor actividad a un pH de 5.0 pero su temperatura óptima fue de 45°C, 12°C más que los de este trabajo. Akinyele y Olaniyi (2013) y Ghori, *et al.*, (2011) evaluaron diferentes temperaturas en un rango de 25-40°C obteniendo la mayor actividad a 32°C y 30°C respectivamente.

Esto permite establecer un rango para cada variable sin establecer un valor específico y de esta manera tener una mayor flexibilidad del proceso al momento de ser llevado a escalamiento.

6. CONCLUSIONES

- El rastrojo de maíz fue el sustrato que produjo un extracto enzimático con mayor actividad celulolítica, lo cual puede deberse a la sinergia entre el alto porcentaje de deslignificación (83%) y el contenido de celulosa inicial (64%).
- En cuanto a las condiciones de inoculación, la condición más favorable para la producción de celulasas fue cuando se inocularon las esporas directamente al medio de fermentación y no con previa adaptación.
- La concentración a la cual se obtuvo un extracto con mayor actividad celulasa total fue de 10 g/L, 3 veces más que 20 g/L y 3.5 veces más que utilizando 30 g/L, se observó que a mayores concentraciones de sustrato *A. niger* ITV-02 dirige su metabolismo más hacia formación de biomasa que a la producción de celulasas.
- Las mejores condiciones evaluadas para producir un extracto con actividad celulolítica fueron a 33°C, pH 5.3 y a 200 rpm obteniendo una actividad celulasa total de 0.215 FPU/mL, 1.6 veces mayor que la obtenida antes de la optimización.

7. RECOMENDACIONES

- Evaluar diferentes pretratamientos sobre el material lignocelulósico y su relación con la producción de enzimas.
- Evaluar diversas fuentes de nitrógeno en el medio de fermentación sobre la producción de celulasas para incrementar la producción de enzimas.
- Evaluar fuentes de carbono que actúen como activadores (xilosa, xilano y lactosa) para ayudar al microorganismo a aumentar su producción enzimática.
- Evaluar la producción simultánea de celulasas y xilanasas con *A. niger* ITV-02.
- Escalar a un fermentador de mínimo 3 L las condiciones óptimas obtenidas en este trabajo.

8. BIBLIOGRAFÍA

Acevedo, D., Granados, C. y Guerrero, E. 2014. Cinética enzimática del bagazo de caña para la producción de glucosa utilizando la enzima *Trichoderma longibrachiatum*. *Información Tecnológica*, 25(5), pp. 65-66.

Acharya, P.B., Acharya, D.K. y Modi, H.A., 2008. Optimization for cellulase production by *Aspergillus niger* using saw dust as substrate. *African Journal of Biotechnology*, 7(22), pp. 4147-4152.

Adsul, M., Ghule, J., Shaikh, H., Singh, R., Bastawde, D. y Varma, A. 2005. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 62(1), pp. 6-10.

Ahamed, A. y Vermette, P., 2008. Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 42, pp. 41-46.

Ahamed, A. y Vermette, P., 2009. Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulase production. *Bioresource Technology*, 100, pp. 5979-5987.

Akinyele, J. y Olaniyi, O., 2013. Investigation of the cellulases production by *Aspergillus niger* NSPR002 in different cultivation conditions. *Innovative Romain Food Biotechnology*, 13(9), pp. 71-79.

Bettache, A., Messis, A., Duchiron, F. y Benallaoua, S. 2014. Solid-State Fermentation Technology for Bioconversion of Lignocellulose. *International Journal of Emergin Technology and Advanced Engineering*, 4(10), pp.486-488.

Bhat, M., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18, pp. 355-383.

Biswas, R., B., Persad, A. y Bisaria, V. 2014. Production of cellulolytic enzymes. In: V. Bisaria y A. Kondo, eds. 2014. *Bioprocessing of renewable resources to commodity bioproducts*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc. Capítulo 5.

Brijwani, K., Singh, H. y Vadlani, P., 2010. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Process Biochemistry*, 45, pp. 120-128.

Camassola, M. y Dillon, A., 2007. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 103, pp. 2196-2203.

- Charita, M. y Kumar, M., 2012. Production, optimization and partial purification of cellulase by *Aspergillus niger* fermented with paper and timber sawmill industrial wastes. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2(1), pp. 120-128.
- Cunha, F.M., Esperança, M.N., Zangirolami, T.C., Badino, A.C. y Farinas, C.S., 2012. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulase. *Bioresource Technology*, 112, pp. 270-274.
- El-Hadi, A., El-Nour, S., Hammad, A. y Kamel, Z., 2014. Optimization of cultural and nutritional conditions for carboxymethylcellulase production by *Aspergillus hortai*. *Journal of Radiation Research and Applied Science*, 7, pp. 23-28.
- Faheina, G., Sabóia, M., Gondim, C., Menezes, D., Alves, K. y Saavedra, G., 2015. Strategies to increase cellulase production with submerged fermentation using fungi isolated from the Brazilian biome. *Acta Scientiarum. Biological Science*, 37(1), pp. 15-22.
- Gao, J., Weng, H., Zhu, D., Yuan, M., Guan, F. y Xi, Y., 2008. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. *Bioresource Technology*, 99, pp. 7623-7629.
- Ghose, T., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure and applied chemistry*, 59(2), pp. 257-268.
- Ghori, M., Ahmed, S., Malana, M. y Jamil, A., 2011. Corn stover-enhanced cellulase production by *Aspergillus niger* NRRL 567. *African Journal of Biotechnology*, 10(31), pp. 5878-5886.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S. y Vivek, R., 2013. A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, Medicine and beyond. *BioMed Research International*, 2013, pp. 1-18.
- Gutierrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N. y Montoya, D., 2013. Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32, pp. 1-12.
- Haq, I., Javed, M. y Khan, T., 2006. An innovative approach for hyperproduction of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes by consortium of *Aspergillus niger* MSK-7 and *Trichoderma viride* MSK-10. *African Journal of Biotechnology*, 5(8), pp. 609-614.
- Headon, D. y Walsh, G., 1994. The industrial production of enzymes. *Biotechnology Advances*, 12, pp. 635-646.
- Heck, J., Hertz, P. y Ayub, M., 2002. Cellulase and xylanase production by isolated amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33, pp. 213-218.
- Infanzón, M.I., 2019. *Obtención de celulasas y xilanasas a partir de hongos autóctonos para la producción de etanol de segunda generación utilizando residuos lignocelulósicos*. Doctorado en Ciencias en Alimentos. Instituto Tecnológico de Tepic.

- International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 2017. *The Enzyme Database*. [en línea] Disponible en: <http://www.enzyme-database.org/class.php>
- Jecu, L., 2000. Solid-state fermentation of agricultural wastes for endoglucanases production. *Industrial Crops and Products*, 11, pp. 1-5.
- Juhász, T., Szengyel, Z., Réczey, K., Siika-Aho, M. y Viikari, L., 2005. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry*, 40, pp. 3519-3525.
- Juturu, V. y Wu, J., 2014. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 33, pp. 188-203.
- Kandari, V., Vajpayee, I., Kumar, D y Gupta, S., 2013. Cellulase and β -glucosidase production by *Trichoderma viride* and *Aspergillus wentii* in submerged fermentation utilizing pretreated lignocellulosic biomass. *Journal of microbiology and biotechnology research*, 3(5), pp. 63-78.
- Karmakar, M. y Ray, R., 2011. Current Trends in Research and Application of Microbial Cellulases. *Research Journal of Microbiology*, 6, pp. 41-53.
- Keshk, S., 2016. Cellulase application in enzymatic hydrolysis of biomass. In: V.K. Gupta, ed. 2016. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, Capítulo 16.
- Klein-Marcuschamer, D., Oleskowicz-Popierl, P., Simmons, B.A. y Blanch, H.W., 2011. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(4), pp. 1083-1087.
- Kubicek, C., 1987. Involvement of a conidial endoglucanase and a plasma-membrane-bound β -glucosidase in the induction of endoglucanase synthesis by cellulose in *Trichoderma reesei*. *Journal of General Microbiology*, 133, pp. 1481-1487.
- Kuhad, R., Deswal, D., Sharma, S., Bhattacharya, A., Kumar, K., Kaur, A., Pletschke, B., Singh, A. y Karp, M., 2015. Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55, pp.249-272.
- Kuhad, R., Gupta, R. y Singh, A. 2011. Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research*, 2011, pp. 1-10.
- Kumar, N., Singhanian, R.R., Sukumaran, R.K. y Pandey, A., 2008. Cellulase production under solid-state fermentation by *Trichoderma reesei* RUT C30: statistical optimization of process parameters. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151, pp. 122-131.
- Kumar, P., Barrett, D., Delwiche, M. y Stroeve, P., 2009. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 48 (8), pp. 3713–3729.

- López, A., Gabor, K., Martens, A., Renckens, B., Claassen, P., Van der Oost, J. y De Vos, W., 2004. Substrate-Induced production and secretion of cellulases by *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), pp. 5238-5243.
- Lynd, L.R., Liang, X., Bidy, M.J., Alle, A., Cai, H., Foust, T., Himmel, M.E., Laser, M.S., Wang, M. y Wyman, C.E., 2017. Cellulosic ethanol: Status and Innovations. *Current opinion in biotechnology*, 45, pp. 202-211.
- Machado, A., Lins, M., Gomes, S. y Pereira, N. 2009. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. *Society for Industrial Microbiology*, 37, pp. 151-158.
- Mandels, M. y Weber, J., 1969. The production of cellulases. In: G. Hajny y E. Reese, eds. 1969. *Cellulases and Their Applications*. American Chemical Society. Capítulo 23.
- Martinez-Anaya, C., Balcazar-Lopez, E., Dantan-Gonzalez, E. y Folch-Mallof, J., 2008. Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Revista latinoamericana de microbiología*, 50, pp. 119-131.
- Matkar, K., Chapla, D., Divecha, J., Nighojkar, A. y Madamwar, D., 2013. Production of cellulase by a newly isolated strain of *Aspergillus sydowii* and its optimization under submerged fermentation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 78, pp. 24-33.
- Mendes, F.B., Atala, D.I.P. y Thoméo, J.C., 2017. Is cellulase production by solid-state fermentation economically attractive for the second-generation ethanol production? *Renewable energy*, 114, pp. 525-533.
- Metz, B., Seidl-Seiboth, V., Haarmann, T., Kopchinskiy, A., Lorenz, P., Seiboth, B. y Kubicek, C., 2011. Expression of biomass-derading enzymes is a major event during conidium development in *Trichoderma reesei*. *Eukaryotic Cell*, 10(11), pp. 1527-1535.
- Miller, G, 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars, *Analytical Chemistry*, 31, pp. 426-428.
- Morán, M.G, 2018. *Estudio de la sacarificación del bagazo de caña de azúcar y Agave angustifolia para la producción de azúcares fermentables*. Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz.
- Mrudula, S y Murugammal, R., 2010. Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submered and solid-state fermentation using coir waster as a substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, pp. 1119-1127.
- Nobuyuki, R., Araújo, C., Melo, L. y Pereira, N., 2012. Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. *Biotechnology*, 163, pp. 38-44.
- Nochure, S.V., Roberts, M.F. y Demain, A.L., 1993. True cellulase production by *Clostridium thermocellum* grown on different carbon sources. *Biotechnology letters*, 15(6), pp. 641-646.

- Oinonen, A.M., Londesborough, J., Joutsjoki, V., Lantto, R. y Vehmaanpera, J., 2004. Three cellulases from *Melanocarpus albomyces* for textile treatment at neutral pH. *Enzyme Microbiol Technology*, 34, pp. 332-341.
- Panagiotou, G., Kekos, D., Macris, B. y Christakopoulos, P., 2003. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid-state fermentation. *Industrial Crops and Products*, 18, pp. 37-45.
- Panchapakesan, A. y Shankar, N., 2016. Fungal Cellulases: An Overview. In: V. K. Gupta, ed. 2016. *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*. Elsevier, Capítulo 2.
- Papagianni, M., 2017. Microbial bioprocesses. In: C. Larroche, M.A. Sanroman, G. Du y A. Pandey, eds. 2017. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Bioprocesses, bioreactors and controls*. Elsevier, Capítulo 3.
- Paredes, D., Álvarez, M. y Ordoñez, S., 2010. Obtención de Enzimas Celulasas por Fermentación Sólida de Hongos para ser Utilizadas en el Proceso de Obtención de Bioalcohol de Residuos del Cultivo de Banano. *Tecnología ESPOL*, 23(1), pp. 81-88.
- Partida-Sedas, G., 2017. *Producción de etanol a partir de jugo y bagazo de sorgo dulce (Sorgum bicolor (L.) Moench) mejorado genéticamente*. Doctorado en Ciencias en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz.
- Patel, K.B., Patel, S.S., Patel, B.K., Chauhan, H.C., Rajgor, M., Kala, J.K., Patel, M.A., Patel, M.G., Patel, A.C., Shrimali, M.D., Modi, A.N. y Chandel, B.S., 2017. Production and optimization of endoglucanase by *Aspergillus sp.*, *Trichoderma sp.* and *Penicillium sp.* *International journal of current microbiology and applied sciences*, 6(4), 1318-1325.
- Payne, C.M., Knott, B.B., Mayes, H.B., Hansson, H., Himmel, M.E., Sandgren, M., Stahlberg, J y Beckham, G., 2015. Fungal cellulases. *Chemical Reviews*, 115(3), pp. 1308-1448.
- Phitsuwan, P., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O., Kyu, K. y Ratanakhanokchai, K., 2012. Present and potential applications of cellulases in agriculture, biotechnology and bioenergy. *Folia Microbiologia*, 58(2), pp. 163-176.
- Ramanathan, G., Banupriya, S. y Abirami, D., 2009. Production and optimization of cellulose from *Fusarium oxysporum* by submerged fermentation. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 69, pp. 454-459.
- Rani, M.E., Kumar, N.V., Gunaseeli, R. y Kannan, N., 2016. Comparative Biochemistry and kinetics of microbial cellulase. In: V.J. Gupta, ed. 2016. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, Capítulo 3.
- Rajendran, K. y Taherzadeh, M., 2014. Pretreatment of lignocellulosic materials. In: V.S. Bisaria y A. Kondo, eds. 2017. *Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts*. New Jersey, Wiley, Capítulo 3.
- Reyes, E., 2015. *Aislamiento y selección de hongos o bacterias productores de celulasas y hemicelulasas a partir de residuos lignocelulósicos para la obtención de*

azúcares reductores. Maestría en Ciencias en Ingeniería Química. Instituto Tecnológico de Orizaba.

Rodríguez, I. y Piñeros, Y., 2007. Producción de complejos enzimáticos celulolíticos mediante el cultivo en fase sólida de *Trichoderma sp.* Sobre los racimos vacíos de palma de aceite como sustrato. *Revista de la facultad de química farmacéutica*, 14(2), pp. 35-42.

Soccol, C.R., Vandenberghe, L.P., Spier, M.R., Karp, S.G., Montibeller, V.W., Salmon, D.N.X., Goelzer, F., Batista, M.C.T. y Soccol, V.T., 2014. Enzymes production during value-addition of agro-industrial wastes. In: S. Kaur y M. Verma, eds. 2014. *Enzymes in value-addition of wastes*. [e-book] Nueva York, Nova Science Publishers, Inc. Capítulo 1.

Sohail, M., Siddiqi, R., Ahmad, A. y Ahmed, S., 2009. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. *New Biotechnology*, 25(6), pp. 437-441.

Suhag, M., Kumar, A. y Singh, J., 2014. Key technologies for the production of lignocellulolytic enzymes. *Environment and we: an international journal of science and technology*. 9, pp. 39-52.

Sukumaran, R., Singhanía, R. y Pandey, A. 2005. Microbial cellulases – Production, applications and challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 64, pp. 832-844.

Sukumaran, R., Singhanía, R., Mathew, G. y Pandey, A., 2009. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Renewable Energy*. 34, pp. 421-424.

Singhanía, R., Adsul, M., Pandey, A. y Patel, A., 2017. Cellulases. In: A. Pandey, S. Negi y C. Soccol, eds. 2017. *Current Developments in biotechnology and Bioengineering*. Elsevier. Capítulo 4.

Singhanía, R., Patel, A., Sukumaran, R., Larroche, C. y Pandey, A., 2013. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource technology*, 127, pp. 500-507.

Singhanía, R., Sukumaran, R., Kumar, A., Larroche, C. y Pandey, A. 2010. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 142, pp. 60-70.

Singhanía, R., Sukumaran, R., Rajasree, K., Mathew, A., Gottumukkala, L y Pandey, A. 2011. Properties of a major β -glucosidase-BGL1 from *Aspergillus niger* NII-08121 expressed differentially in response to carbon sources. *Process Biochemistry*, 46, pp. 1521-1524.

Srivastava, N., Srivastava, M., Mishra, P.K., Gupta, V.K., Molina, G., Rodriguez-Couto, S., Manikanta, A. y Ramteke, P.W., 2017. Applications of fungal cellulases in biofuel

production: advances and limitations. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82(3), pp. 2379-2386.

Teal, A.R. y Wymer P.E., 1994. *Enzymes and their role in biotechnology*. [e-book] Biochemical Society.

Theather, R. y Wood, P., 1982. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumerations and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(4), 777-780.

Tolan, J. y Foody, B. 1999. Cellulase from submerged fermentation. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 65, 41-67.

Torres, M. 2009. *Obtención de enzimas hidrolíticas a partir de una cepa del hongo Aspergillus ficuum mediante fermentación en el medio sólido*. Licenciatura en Bioquímica. Universidad Austral de Chile.

Tucker, M.P., Mohagheghi, M., Grohmann, K. y Himmel, M.E., 1989. Ultra-thermostable cellulases from *Acidothermus cellulolyticus*. Comparison of temperatura optima with preciously reported cellulases. *Biotechnology*, 7, pp. 817-820.

Wang, L., Ridgway, D., Gu, T. y Moo-Young, M., 2005. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnology advances*, 23, pp. 115-129.

Wilson, D., 2016. Microbial diversity and cellulase production. In: V.K. Gupta, ed. 2016. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, Capítulo 5.

Wood, T.M. y McCrae, S.I., 1977. Cellulase from *Fusarium solani*, purification and properties of C1 component, *Carbohydrate Resources*, 57, pp. 117-133.

Yamane, K., Suzuki, H. y Nisizawa, K., 1970. Purification and properties of extracellular and cellbound cellulase components of *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa*. *Journal of Biochemistry*, 7, pp. 19-35.

Zhang. X. y Zhang, Y., 2013. Cellulases: Characteristics, sources, production and applications. In: S. Yang, H. El-Enshasy y N. Thongchul, eds. 2013. *Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. Capítulo 8.

8. APÉNDICES

Apéndice A

La cámara de toma está formada por:

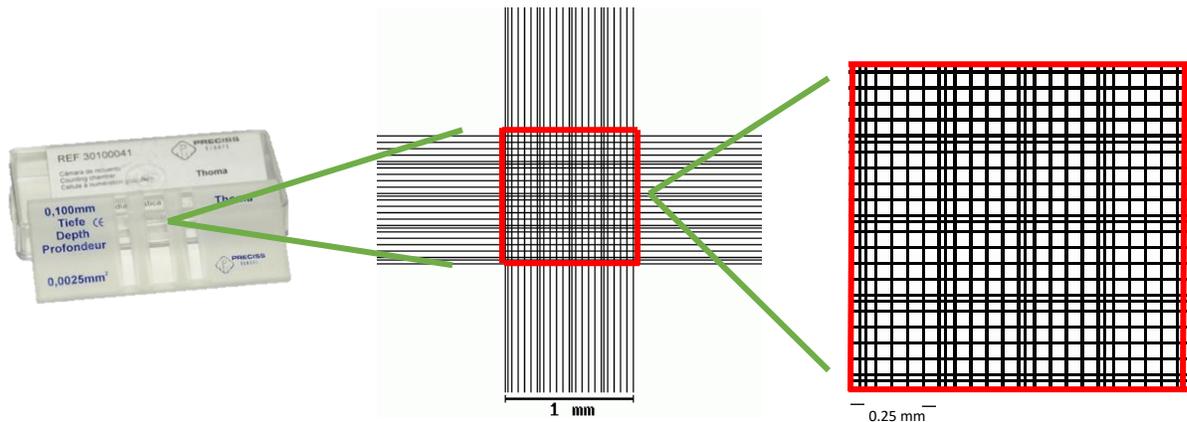


FIGURA 8.1 Cámara de Thoma.

1. Cuadro grande (centro de la cruz, 400 cuadros pequeños): $1 \text{ mm}^2/400$ cuadros
2. Cuadro mediano (formado por 16 cuadros): $0.25 \text{ mm} \times 0.25 \text{ mm}$
3. Cuadro pequeño: $0.05 \text{ mm} \times 0.05 \text{ mm} = 0.0025 \text{ mm}^2$

Líneas separadoras de cuadros medianos (en rojo): 0.025 mm del extremo del cuadro

La muestra se colocó con una pipeta Pasteur en una las ranuras de la cámara previamente limpiada y con el cubreobjetos encima, poniendo la punta de la pipeta lo suficientemente cerca para que por capilaridad las esporas se distribuyan en la cámara. El volumen aproximado a considerar para realizar el conteo es de $20 \times 10^{-6} \text{ mL}$.

La concentración de esporas (X) por mililitro está dada por la siguiente ecuación (8.1):

$$X = \frac{N * d}{Nc * 4} * 10^6 \quad (8.1)$$

Donde:

N=Número de esporas contadas

d= Dilución empleada

Nc= Número de cuadros contados

Posteriormente se empleó la ecuación 8.2 para determinar el volumen a añadir de la solución de esporas obtenida en la fermentación:

$$V_1 * C_1 = V_2 * C_2 \quad (8.2)$$

Donde:

V₁= Volumen de fermentación (mL)

C₁= 6x10⁶ esp/mL

V₂= Volumen de solución de esporas que se debe añadir (mL)

C₂= X (Concentración de esporas)